

Messung von cyclischem
Adenosin-3',5'-monophosphat in porcinen
und humanen Schilddrüsenschnitten
nach TSH- und
Morbus Basedow-IgG-Stimulation

Augusto Manuel Freire Cardoso de Mira

Dass
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554009_0071

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München

Direktor: Professor Dr. E. Buchborn

Messung von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat
in porcinen und humanen Schilddrüsenschnitten
nach TSH- und Morbus Basedow-IgG-Stimulation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Augusto Manuel Freire Cardoso de Mira
aus Lissabon/Portugal

1984

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. C. R. Pickardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.1984

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Mein Dank gilt

Frau Professor Dr. med C. R. Pickardt
für die freundliche Überlassung des
Themas und ihre unermüdliche Hilfe.

Herrn Dr. med. A. Witte
für seine Anregungen und tatkräftige
Unterstützung.

Frau A. Isemann und
Frl. L. Hörterer für die
angenehme Zusammenarbeit.

Frl. F. Haag für die Hilfe bei der
Erstellung der Fotos.

Frau Zivulovic für ihren Fleiß
und Ordnungssinn.

1. EINLEITUNG

	Seite
1.1 Die Pathogenese des Morbus Basedow (MB)	1
1.2 Genetische Faktoren beim MB	2
1.3 Methoden zur Messung der Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper	3
1.4 Die verdrängende Aktivität (TDA) und die stimulierende Aktivität	4
1.5 Charakterisierung der Schilddrüse-stimulierenden Antikörper	5
1.6 Koexistenz von Schilddrüsen-Antikörpern mit unterschiedlicher Wirkung beim MB	6
1.7 Die klinische Relevanz der Schilddrüsen-Antikörper-Bestimmung	8
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	10

2. METHODIK 12

2.1 Material	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Schilddrüsengewebe	12
2.1.3 Seren und Plasmaphoresen	12
2.1.4 Andere Substanzen	13
2.2 Der TSAb-Assay	14
2.2.1 Der Assay-Puffer	14
2.2.2 Proben	15
2.2.2.1 Human-Albumin-Lösung zur Ermittlung der basalen cAMP-Bildung	15
2.2.2.2 Das Thyrotropin (TSH)	15
2.2.2.3 IgG	15
2.2.2.4 Subfraktioniertes IgG	16
2.2.3 Versuchsablauf	16

2.3	Radioreceptor-Assay	18
2.4	Bestimmung der Schilddrüsenhormone und Messung der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium	18
3.	ERGEBNISSE	19
3.1	Stimulierung porcinen Gewebes	19
3.1.1	Einfluß von Kochsalzes und Phospho- diesterase-Hemmer im Inkubationsmedium auf die cAMP-Bildung	19
3.1.2	TSH-Stimulation der cAMP-Bildung	20
3.1.2.1	Vergleich der cAMP-Akkumulation im Gewebe verschiedener Schilddrüsen nach TSH-Stimulierung	20
3.1.2.2	Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung nach TSH-Stimulation	21
3.1.2.3	Dosiswirkungsbeziehung zwischen TSH- und cAMP-Anstieg	22
3.1.3	Stimulierung der cAMP-Akkumulation durch MB-IgG	23
3.1.3.1	Vergleich der cAMP-Akkumulation im Gewebe verschiedener Schilddrüsen nach MB-IgG- Stimulierung	23
3.1.3.2	Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung nach MB-IgG-Stimulation	24
3.1.3.3	Stimulation durch das IgG vom MB-Patienten L. Vergleich mit humanem Gewebe	26
3.2	cAMP-Akkumulation nach Stimulierung humanen Schilddrüsen Gewebes	28
3.2.1	Einfluß von Kochsalz im Inkubationsmedium auf die cAMP-Bildung	28
3.2.2	cAMP-Akkumulation in humanen Schilddrüsen nach TSH-Stimulierung	29

3.2.2.1	cAMP-Akkumulation nach TSH-Stimulierung im excidierten Gewebe von Patienten mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen	29
3.2.2.2	Dosiswirkungsbeziehung zwischen TSH- und cAMP-Anstieg	30
3.2.3	Stimulation der cAMP-Akkumulation durch MB-IgG	31
3.2.3.1	cAMP-Bildung nach MB-IgG im excidierten Schilddrüsengewebe von Patienten mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen	31
3.2.3.2	Dosiswirkungskurve von IgG eines MB (IgG (L)) bzw. eines Autonomen Adenoms (IgG (S)) auf paranodulärem Gewebe	32
3.2.3.3	Stimulation der cAMP-Bildung durch sechs individuelle MB-IgG und durch positives "pool"-IgG. Vergleich mit TDA	33
3.2.3.4	TSAb-Assay mit MB-IgG am eigenen Gewebe des Patienten	35
3.2.3.5	Kombination verschiedener IgG bzw. IgG plus TSH	37
3.2.3.6	Stimulation der cAMP-Bildung durch an der Protein A-Sepharose subfraktioniertes MB-IgG	39
3.2.4	Untersuchung des Inkubationsmediums	40
3.2.4.1	Vergleich der cAMP-Antwort auf Stimulation durch TSH und MB-IgG im Gewebe und im Inkubationsmedium	40
3.2.4.2	Verhalten der Schilddrüsenhormone (T_3 und T_4) und Glucose im Inkubationsmedium	41
3.2.5	Vergleich der Stimulierbarkeit der cAMP-Bildung durch natives Serum und präpariertes IgG von Basedow-Patienten	41
4.	DISKUSSION	42

5.	ZUSAMMENFASSUNG	50
6.	ANHANG	53
6.1	Literaturverzeichnis	53
6.2	Abkürzungsverzeichnis	63

1. EINLEITUNG

1.1 Die Pathogenese des Morbus Basedow (MB)

Die immunogene Hyperthyreose, Mitte des letzten Jahrhunderts von Carl von Basedow in Deutschland beschrieben, nimmt unter den Autoimmunerkrankungen eine besondere Stellung ein, denn einige der hier auftretenden Autoantikörper weisen eine funktionsstimulierende Wirkung auf, sie ahmen den Effekt des hypophysären Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH) an den Schilddrüsenzellen nach. Es wird angenommen, daß alle Individuen "forbidden clones" von Lymphozyten produzieren können, die gleichsam die Autotoleranz des Organismus durchbrechen und potentiell auf autologe Antigene mit einer spezifischen Immunantwort reagieren (56). Normalerweise werden jedoch diese Klone von den T-Suppressorzellen, die sehr wahrscheinlich eine Kontrollfunktion ausüben, unterdrückt, so daß es nicht zu einer Interaktion mit dem komplementären Antigen kommt (56). In Individuen mit einer angeborenen Prädisposition für MB wird ein genetisch bedingter Defekt des Immunsystems vermutet; die verbotenen Klone entgehen jener Aufsicht, die im Normalfall von den T-Suppressorzellen gewährleistet wird (56). Das gehäufte Auftreten anderer immungenetischer Erkrankungen bei MB-Patienten (56) weist auf eine allgemeine "Labilität" des Immunsystems hin und spricht gegen eine primäre Erkrankung der Schilddrüse.

1.2 Genetische Faktoren beim MB

Die hereditäre Disposition zu MB ist heute unbestritten, zumal Schilddrüsenantikörper seit Einführung neuer Nachweismethoden häufiger bei Verwandten von MB-Patienten gefunden wurden (21). Es handelt sich wahrscheinlich "um einen polygenen multifaktorellen Typ der Vererbung, bei dem die kombinierte Einwirkung verschiedener Gene zusammen mit exogenen Faktoren von Bedeutung ist" (41). Bei eineiigen Zwillingen ergab sich eine Konkordanz in 47%, bei zweieiigen nur in 3,1% (55).

Individuen mit bestimmten genetisch festgelegten Histokompatibilitätsantigenen, besonders HLA-B8 und HLA-DR3, zeigen ein höheres Erkrankungsrisiko (6); die Wahrscheinlichkeit einer Remission nach Beendigung der thyreostatischen Therapie scheint bei HLA-DR3 am geringsten zu sein (6), was allerdings von anderen Autoren nicht bestätigt wurde (18).

1.3 Methoden zur Messung der Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper

Die Anwesenheit eines Serumbestandteils bei MB-Patienten, der in vivo eine Stimulierung von Meerschweinchen-Schilddrüsen bewirkte, wurde erstmals 1956 von Adams und Purves festgestellt (1). Bald danach entwickelte McKenzie den "mouse bioassay" für Thyrotropin (TSH) (34) und konnte den stimulierenden Effekt jener Substanz nachweisen (33), die wegen des im Vergleich zu TSH verspätet und protahiert eintretenden Wirkungsmaximums long-acting thyroid stimulator (LATS) genannt wurde (33). Seitdem sind mehrere Untersuchungen durchgeführt worden, die eine zuverlässige Messung der Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper im Serum anstreben.

Die wichtigsten Nachweismethoden für Schilddrüsen-stimulierende Antikörper sind in Tab. 1 aufgeführt. Wir unterscheiden die Assays, die unmittelbar eine stimulierende Aktivität messen, von den Assays, die eine Interaktion von Receptor und Antikörper nachweisen. Aus den Resultaten dieser letzten Methoden kann, wenn überhaupt, nur indirekt auf die stimulierende Wirkung rückgeschlossen werden.

Tab. 1 gibt für die verschiedenen Nachweismethoden die Inzidenz positiver Befunde an, die bei der Untersuchung von Patienten mit klinisch gesichertem MB ermittelt wurde. Die nicht ganz übereinstimmende Technik der verschiedenen Labors, die Auswahl des Patientenkollektivs, die Diagnosekriterien, die Häufigkeit und der Zeitpunkt der Messungen, die eingeschlagene Therapie mögen zumindest teilweise die stark abweichenden Ergebnisse erklären. Einige der hier auftretenden Unklarheiten versuchten Schleusener et al. dadurch zu überwinden, daß sie die diagnostischen Kriterien und den Zeitraum, in dem Messungen durchgeführt wurden, festlegten (51). Die kumulative Antikörper-Bestimmung (mehrere Messungen innerhalb von 10 Jahren) ergab bei einem höheren Prozentsatz der Patienten positive Antworten als einzelne Messungen.

Bezeichnung der Antikörper	Abkürzung	Methode	Prozentsatz der positiven Ergebnisse bei MB-Patienten
I. Stimulierende Assays			
Long-acting thyroid stimulator	LATS	Stimulierung der Schilddrüse bei der Maus im Bioassay	30 - 50 % (36)
Human thyroid stimulator	HTS	cytochemische Veränderung der Meer-schweinchen-Schilddrüse in vitro	(9)
Human thyroid stimulator	HTS	Bestimmung der Zahl der Kolloid-tröpfchen im Gewebe der menschlichen Schilddrüse	(46)
Human thyroid adenylate cyclase stimulator	HTACS	Stimulation der Adenylat Cyclase in humanen Schilddrüsenmembranen	(24)
Thyroid-stimulating immunoglobulin	TSAb	cAMP-Bildung in Schilddrüsen-Schnitten	92 % (62) 81,5 % (53) 50 % (8)
Thyroid-stimulating antibody			
II. Die Interaktion am thyroid-stimulator-rezeptor messende Assays			
Long-acting thyroid-stimulator-protector	LATS-P	Bindung an menschl. Schilddrüsen-gew. verhindert ("protects") anschließende Bindung von LATS	90 % (2)
Thyroid-stimulating antibodies	TSAb	Verdrängung des radioaktiven TSH im Radioreceptor-Assay	100 % (40)
Thyroid-stimulating immunoglobulin	TSI		76 % (49)
Thyrotropin displacement activity	TDA		63 % (28)
TSH-binding inhibitor immunoglobulin	TBII		54 % (45)
TSH-binding inhibitor antibodies	TBIAb		

Tab. 1 Nachweismethoden für Schilddrüsen-stimulierende Antikörper.

Die verwirrende Vielfalt der Nomenklatur in Tab 1 rührt von den verschiedenen Nachweismethoden her, die, nachdem LATS nur bei ca 50% (s.Tab. 1) der MB-Patienten vorkam, mit dem Ziel einer höheren Empfindlichkeit entwickelt wurden. In der vorliegenden Arbeit zogen wir es vor, nur die Antikörper, die zur Akkumulation von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) in Schilddrüsen-Schnitten führen, als thyroid-stimulating antibodies (TSAb) zu benennen. Die Wirkung von Antikörpern, die das radioaktive Thyrotropin von der Zellmembran im Radioreceptorassay (RRA) verdrängen, nennen wir TSH verdrängende Aktivität (TSH-displacing activity, TDA), denn vollständige Klarheit herrscht bis jetzt weder über die Art der Interaktion an der Zellmembran noch über die Folgereaktionen, die ausgelöst werden.

1.4 Die verdrängende Aktivität (TDA) und die stimulierende Aktivität

Die verdrängende Aktivität (TDA) im RRA und die stimulierende Aktivität der Schilddrüsen-Antikörper werden, seitdem die zitierten Nachweismethoden ihre Messung ermöglichen, in zahlreichen Arbeiten verglichen. Mukhtar et al. fanden im Verdrängungsassay und im human thyroid adenylate cyclase stimulator (HTACS) Assay (s. Tab.1) korrespondierende Ergebnisse und folgerten daraus, daß die verdrängende Wirkung der Antikörper ihre stimulierende Aktivität widerspiegelt (40). Es sei daran erinnert, daß Mukhtar et al. bei allen unbehandelten MB-Patienten verdrängende Antikörper nachweisen konnten (40). Eine signifikante Korrelation zwischen TDA und der stimulierenden Aktivität wird von Bliddal et al. postuliert; bei einigen MB-Patienten beobachteten sie jedoch eine vollständige Dissoziation beider Aktivitäten (10).

Wie Kuzuya et al. (28) und Sugeno et al. (53), so verneinen auch McKenzie und Mitarbeiter (38) das Vorhandensein einer Korrelation zwischen verdrängender und stimulierender Aktivität.

1.5 Charakterisierung der Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper

Kriss et al. bewiesen, daß LATS ein Antikörper ist, der zu den Immunglobulinen der Klasse G (IgG) gehört (26). Zahlreiche Arbeiten, die nachfolgten, bemühten sich um eine nähere Charakterisierung der Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper. Drei Arbeiten (27, 42, 32) beschreiben eine partielle Hemmung der LATS-Aktivität durch anti-Kappa und anti-Lambda Antiseren. Diese Ergebnisse wurden als Hinweise dafür gedeutet, daß Schilddrüsen-stimulierende Antikörper polyklonalen Ursprungs sind.

Im Gegensatz dazu vertritt Zakarija in einer jüngeren Publikation die Ansicht, daß die Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper eine beschränkte Heterogenität aufweisen (63). Fast die gesamte stimulierende Aktivität wurde im IgG vom Lambda-Typ und in der Subklasse IgG₁ gefunden (63). Die Protein A-Sepharose-Chromatographie und die anschließende Affinitäts-Chromatographie mit Antiseren gegen IgG₂ und IgG₄ dienten der Trennung und Reinigung der stimulierenden IgG₁ (63). In einer früheren Arbeit gelangten Ochi et al. zu ähnlichen Ergebnissen (44). Auch die Anreicherung der stimulierenden Aktivität in der IgG-Fraktion mit einem pI zwischen 8 und 9, die durch präparative isoelektrische Fokussierung getrennt wurde, legte die Vermutung einer eingeschränkten Heterogenität nahe (60). Eine Rekombination der leichten und der schweren Ketten der IgG nach vorhergehender Auftrennung führte jedoch zu einem Verlust der biologischen Aktivität. Nach Ansicht der Autoren spricht dieser Befund gegen die Hypothese monoklonaler Antikörper (63).

Zudem wurde gezeigt, daß die Fab-Fragmente der IgG für die stimulierende Wirkung verantwortlich sind (35, 15).

1.6 Koexistenz von Schilddrüsen-Antikörpern mit unterschiedlicher Wirkung beim MB

Mäenpää (31) und Zakarija et al. (64) berichten über Kinder, bei denen eine hypothyreote Phase einer später entwickelten Hyperthyreose voranging. Zakarija et al. nehmen an, daß im Blut dieser Kinder stimulierende und blockierende Antikörper koexistieren und daß die Verzögerung der Schilddrüsen-Überfunktion von der anfänglichen Anwesenheit blockierender Antikörper herrührt (64). Die Mutter des von Zakarija und McKenzie untersuchten Kindes zeigte eine stimulierende Aktivität im TSAb-Assay (64). Bei einer niedrigeren Konzentration des mütterlichen IgG trat eine stärkere stimulierende Wirkung zutage, deren Ursache nach Zakarija und Mitarbeitern in einer Verdünnung der blockierenden Antikörper liegen könnte (64).

Wir wollen noch erwähnen, daß es Kohn et al. mit Hilfe von Hybridomen gelang, monoklonale Antikörper gegen TSH Receptor Material der Schilddrüsen-Zellmembranen zu gewinnen (25). Einige Antikörper verdrängen das radioaktive Thyrotropin von der Zellmembran, ohne jedoch eine Stimulation der cAMP-Bildung hervorzurufen, und zwar weder in Schilddrüsen-Kulturzellen noch in Schilddrüsen-Plasmamembran-Präparationen (25). Diese Antikörper konnten aber die Stimulation der Adenylat Cyclase in beiden Systemen hemmen und wurden deshalb "blockierende Antikörper" genannt. Andere Antikörper waren Stimulatoren der cAMP-Bildung mit nur schwacher TDA. Stimulierende Antikörper wiesen eine stärkere Reaktivität mit der Gangliosid-Komponente des TSH-Rezeptors auf, blockierende Antikörper hingegen mit der Glykoproteinkomponente (25).

Bei MB-Patienten mit vergrößerter Schilddrüse fanden Drexhage et al. (16) Antikörper, die, ähnlich wie das Thyrotropin, das Wachstum stimulieren (thyroid growth stimulating immunoglobulins, kurz TGI). Die Frage nach TGI ist in einer jüngeren Arbeit von Valente et al. erneut aufgeworfen worden (54). In 85% der MB-

Patienten wurden TGI nachgewiesen, die neben den cAMP-stimulierenden Antikörpern anwesend sind (54). Nicht nur die TSAb, sondern auch die Größe der Schilddrüse, von TGI beeinflusst, werden für die Hyperthyreose verantwortlich gemacht: eine vergrößerte Schilddrüse könnte schon bei geringer Stimulierung zu einer Überfunktion führen (54). Eine Remission der Hyperthyreose sollte erst dann erwartet werden, wenn sowohl die cAMP-stimulierende als auch die Wachstum-stimulierende Aktivität abnehmen (54). Chiovato et al. gingen der Frage nach, ob bei MB-Patienten TGI-blockierende Antikörper auftreten (12). Bei einigen thyreotoxischen Patienten ohne Schilddrüsen-Vergrößerung konnten sie in der Tat TGI-blockierende Antikörper nachweisen, die neben den cAMP-stimulierenden Antikörpern koexistieren.

Auf den oben zitierten Arbeiten gründet die Annahme, daß beim MB verschiedene Antikörper vorliegen können, und zwar

- a) cAMP-Bildung stimulierende Antikörper (TSAb)
- b) TSAb-blockierende Antikörper
- c) TGI
- d) TGI-blockierende Antikörper.

Unterschiedliche Aktivitäten der aufgeführten Antikörper scheinen in individuellen Fällen das klinische Bild zu prägen. Eine Interpretation des Krankheitsbildes sollte daher nicht nur auf die Messung einzelner Antikörper beruhen.

Soll eine einseitige irreführende Perspektive vermieden werden, sollte die Möglichkeit der Koexistenz von Antikörpern verschiedener biologischer Wirkungen berücksichtigt werden.

1.7 Die klinische Relevanz der Schilddrüsen-Antikörper-Bestimmung

Der Hyperthyreose können verschiedene Erkrankungen zugrunde liegen:

- 1) eine immunogene Hyperthyreose vom Typ des MB
- 2) eine autonome Struma; dazu gehören
 - a) das noduläre oder multifokale autonome Adenom (AA)
 - b) die disseminierte Autonomie
- 3) TSH produzierende Tumoren (sehr selten).

Differentialdiagnostisch bereiten die immunogene Hyperthyreose vom Typ des MB ohne Augenzeichen und die disseminierte Autonomie Schwierigkeiten. Der Nachweis von Autoantikörpern ist ein wichtiges Kriterium zur Abgrenzung der immunogenen Hyperthyreose ohne Orbitopathie von der disseminierten Autonomie. Die Antikörper-Bestimmung ist nur bei positivem Ausfall aussagekräftig; ein negativer Befund schließt eine Immunhyperthyreose nicht aus. Tab.1, in der wir den Prozentsatz positiver Antworten für die verschiedenen Nachweismethoden bei der Untersuchung von MB-Patienten aus der Literatur angeben, zeigt dies besonders deutlich.

Die Schilddrüsen-Antikörper-Bestimmung hat in der Klinik nicht nur eine differentialdiagnostische Bedeutung. Darüber hinaus scheint sie eine prognostische Aussage über die Weiterentwicklung der Krankheit zu ermöglichen. Mehrere Autoren vermuten, man könne, sofern er vor Behandlungsbeginn positiv war, aus dem Antikörperverhalten die Wahrscheinlichkeit einer dauerhaften Remission nach Absetzen der Therapie ablesen (13, 57, 62). Diese Annahme blieb jedoch nicht unangefochten, zumal beschrieben wurde, daß Patienten erst in der Remission positive Befunde aufwiesen (50). Zur Abschätzung einer Prognose, die einen Hinweis für den optimalen

Zeitpunkt des Absetzens der Therapie geben soll, bieten sich die Messung sowohl der TSH-verdrängenden wie der cAMP-stimulierenden Aktivität an. Davies et al. (13) und Witte et al. (57) beobachteten, daß das Verschwinden der TDA mit einer gewissen Sicherheit das Auftreten einer dauerhaften Remission anzeigt.

Auch der TSAb-Assay wurde zur Ermittlung einer Prognose herangezogen (62). Der TSAb-Assay, der, wie bereits erwähnt, unmittelbar die biologische Aktivität in vitro mißt, hat eine höhere Spezifität für den Nachweis der immunogenen Hyperthyreose. Daher ermöglicht er nach Zakarija et al. (62) eine sicherere Prognose als der RRA. Hohe TSAb-Werte, vor Anfang der Therapie gemessen, sollen andeuten, daß während einer thyreostatischen Behandlung wahrscheinlich keine Remission entstehen wird (61). TSAb scheint also ein wertvoller Parameter zu sein, wenn der Kliniker über die Anwendung und die Dauer der Therapie entscheiden soll. Indes, der technische Aufwand, in erster Linie die Notwendigkeit mit frischem humanem Schilddrüsengewebe arbeiten zu müssen, sprechen gegen die Einführung des TSAb-Assay als Routinemethode.

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Hormone beeinflussen die Zellfunktionen durch eine Wechselwirkung mit den spezifischen Rezeptoren an der Oberfläche der Zellmembran. Das cAMP, ein Nucleotid, spielt als Vermittler der Wirkung mehrerer Hormone, z.B. des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH), des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH), des TSH eine Rolle (30). Der Hormon-Rezeptor-Komplex aktiviert die Adenylat Cyclase, den Effektor, der als Enzym die Bildung von cAMP, dem "second messenger", stimuliert (30). Der TSAb-Assay, der in Anlehnung an die Methode von Zakarija et al. (62) durchgeführt wurde, ermöglicht es, aus der Höhe des in den Zellen gebildeten cAMP die stimulierende Wirkung von TSH und IgG von Basedow-Patienten abzulesen.

Die stimulierende Wirkung von Thyrotropin und MB IgG auf frisches porcines Gewebe sollte unter Verwendung mehrerer Schilddrüsen, die wir aus dem Schlachthof besorgten, geprüft werden.

Der Einfluß von Kochsalz und von Phosphodiesterase-Hemmern (Theophyllin und 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin, kurz MIX) auf die cAMP-Bildung wurde geprüft, um möglichst günstige Inkubationsbedingungen festzulegen. Die Kinetik, die bei Stimulation sowohl durch TSH als auch durch MB-IgG geprüft wurde, half uns eine Inkubationszeit zu ermitteln, nach der eine möglichst hohe cAMP-Bildung meßbar wird.

Der Vergleich zwischen der cAMP-Akkumulation im porcinen und im humanen Gewebe bei MB-IgG-Stimulation sollte klären, ob die Wirkung Schilddrüsen-stimulierender Antikörper speziesspezifisch ist. Deutliche Zunahmen der cAMP-Konzentration im porcinen Gewebe nach MB-IgG-Stimulation könnten von der Anwendung menschlichen Gewebes, das unvergleichlich schwerer zu besorgen ist, dispensieren. Wir untersuchten die Wirkung von Thyrotropin, verschiedenen MB-IgG und Serum auf Schnitte von humanen Schilddrüsen. Das Gewebe stammte von Patienten mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen. Die Abhängigkeit sowohl der Basalwerte als auch der Antworten des cAMP auf die Stimuli von dem jeweils angewandten Gewebe sollte ergründet werden.

Der Einfluß von Kochsalz auf die cAMP-Bildung wurde an menschlichem Gewebe untersucht. Wir versuchten anhand verschiedener MB-IgG, die Frage zu beantworten, ob eine Korrelation zwischen der biologischen Aktivität im TSAb-Assay und der TDA besteht.

Aus dem oben Gesagten geht hervor, daß beim MB Antikörper mit unterschiedlicher Wirkung vorhanden sein können. Die Kombination verschiedener Proben sollte uns helfen, durch die Interaktion jene blockierende Wirkung von MB-IgG, die öfters beschrieben wurde (11, 25, 31, 64), zu erfassen. Die Frage, ob MB-IgG, das bei positivem TDA-Befund keine Stimulation im TSAb-Assay hervorruft, andere Stimulatoren blockiert, stand hierbei im Vordergrund.

Die Subfraktionierung des MB-IgG mittels der Protein-A-Sepharose-Chromatographie wurde in der Erwartung durchgeführt (3, 17, 58, 59), daß eine der eluierten Fraktionen eine höhere biologische Aktivität im TSAb-Assay zeigen würde. Die höhere biologische Aktivität des aufgetrennten IgG könnte sowohl von einer Anreicherung der cAMP-stimulierenden Antikörper in einer Fraktion als auch von der Eliminierung blockierender Antikörper und anderer Störfaktoren herrühren.

Die von einigen Autoren postulierte Korrelation zwischen dem cAMP-Anstieg im Medium und im Gewebe wurde geprüft (7, 8). Bestünde sie, könnte von der Höhe des cAMP im Medium auf die Höhe des cAMP im Gewebe rückgeschlossen werden. Die Homogenisierung des Schilddrüsengewebes, die der Extraktion des cAMP dient, wäre dann überflüssig.

Wir sind der Frage nachgegangen, ob die Schilddrüsen-Schnitte nicht nur cAMP, den "second messenger", sondern auch die Schilddrüsenhormon-Produktion stimulieren.

Nach den Untersuchungen mit reinem IgG wollten wir klären, ob natives Serum von MB-Patienten im TSAb-Assay eine Stimulation hervorruft.

2. METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Das Gewebe wurde mit Hilfe von einem Mikrotom (Tissue Slicer Stadie-Riggs, Arthur H. Thomas Company, Philadelphia) und von Klingen (Tissue slicer blades) derselben Firma präpariert. Wir homogenisierten das Schilddrüsengewebe in Glashomogenisatoren (tissue grind tubes, Vineland, New Jersey).

2.1.2 Schilddrüsengewebe

Die porcinen Schilddrüsen wurden im Schlachthof besorgt. Das humane Schilddrüsengewebe stammte von Patienten, die wegen ihrer Schilddrüsenerkrankung operiert wurden (s. Tab. 2).

Die Schilddrüsen wurden, sobald wir sie für den jeweiligen Versuch präparierten, mit dem in Tab. 2 angegebenen kleinen Buchstaben bezeichnet.

Für den RRA wurde eingefrorenes humanes Schilddrüsengewebe präpariert (3, 58).

2.1.3. Seren und Plasmaphoresen

Die Ionenaustaschchromatographie, die nach Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt wurde, diente der Trennung des IgG vom Serum. Die großen Buchstaben in Klammern sind eine willkürliche Bezeichnung für den Patienten, aus dessen Serum oder Plasmaphorese IgG präpariert wurde. IgG (L) heißt z.B.: IgG vom Patienten L.

Humane Schilddrüse	Diagnose des operierten Patienten	Therapie vor der Schilddr.-Operation	Prepariertes Gewebe
a	Struma nodosa, Grad III euthyreot	-	paranodulär
b	Struma nodosa, Grad II euthyreot	L-Thyroxin	paranodulär
c	Struma nodosa, Grad I-II euthyreot	-	paranodulär
d	Struma nodosa, Grad II mit dekompensiertem AA re.	-	paranodulär
e	Struma nodosa, Grad II mit AA li.	-	paranodulär
f	Struma nodosa, Grad I-II mit AA li.	-	paranodulär
g	Struma diffusa, Grad II bei MB	Carbimazol	hyperplastisch
h	Struma diffusa, Grad II bei MB	Carbimazol Jodid	hyperplastisch
i	Struma nodosa, Grad II mit dekompensiertem AA re.	-	Adenomgewebe
j	Struma diffusa, Grad II bei MB	Carbimazol Jodid	hyperplastisch
k	Struma diffusa, Grad III bei MB	Carbimazol Jodid	hyperplastisch
l	Struma diffusa, Grad II bei MB	Carbimazol Jodid	hyperplastisch

Tab. 2

Exidiertes humanes Schilddrüsengewebe, das für die Durchführung der TSAb-Assays präpariert wurde.
(AA = autonomes Adenom).

IgG (A), IgG (H), IgG (T) und IgG (V) wurden aus den Seren der jeweiligen Patienten gewonnen. IgG (L) und IgG (D) wurden aus dem jeweiligen Plasmaphorese-Material getrennt. Die obengenannten IgG stammten von Patienten bei denen ein MB diagnostiziert wurde. Sie waren ohne Ausnahme im TDA-RRA positiv. Verschiedene IgG von MB-Patienten wurden zusammengefügt und später im TSAb-Assay als positiver "pool" eingesetzt. Zuvor wurden diese IgG im TDA-RRA einzeln untersucht: die TDA-Befunde waren ausnahmslos positiv und lagen zwischen 40% und 60%.

Von der Plasmaphorese des Patienten S, bei dem ein Autonomes Adenom (AA) diagnostiziert und wurde und TDA negativ war, trennten wir das normale IgG, das uns als Kontrolle dienen sollte. IgG zahlreicher Patienten, bei denen kein Anhalt für das Vorliegen einer immunogenen Hyperthyreose bestand, wurden zu einem negativen "pool" zusammengefügt, das wir in einigen Versuchen ebenfalls als Kontrolle verwandten.

Im Versuch mit nativem Serum wurden die Seren von den MB-Patienten L und N eingesetzt. Als Kontrolle dienten die Seren von Patient S (AA) und von Patient G (blande Struma diffusa Grad I).

2.1.4 Andere Substanzen

Cyclic AMP Ria Kit von Becton und Dickinson diente der Bestimmung des cAMP. Mit Hilfe des Human-Albumins, reinst von Behring, wurden die Basalwerte ermittelt. Thyrotropic Hormon von Sigma stimulierte das Schilddrüsengewebe.

Theophyllin von Merck und 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (MIX) von Sigma hemmten die Phosphodiesterase.

Als Anionenaustauschgel wurde DE-32-Cellulose (Diäthylaminoäthyl-Cellulose) von der Firma Whatman, England, und für die Affinitäts-Chromatographien Protein A-Sepharose Cl-4B von der Firma Pharmacia, Schweden, verwendet.

Alle übrigen Substanzen waren "pro analysi" von der Firma Merck, Darmstadt.

2.2 Der TSAb-Assay

Das Medium, in dem das Schilddrüsengewebe, dessen cAMP-Akkumulation wir anschließend gemessen haben, inkubiert wurde, bestand aus 200 μ l Assay-Puffer und 200 μ l Probe.

2.2.1 Der Assay-Puffer

Eine 1,3% Bikarbonat (NaHCO_3)-Lösung (20 ml) wurde vor Beginn des TSAb-Assays hergestellt und für ca eine Stunde mit 100% CO_2 begast.

Die konzentrierten Stocklösungen 1 bis 4 wurden zubereitet.

1. 5,75% KCl
2. 6,1 % CaCl_2
3. 19,1 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
4. 10,55% KH_2PO_4

Wir gaben zu 50 ml aqua dest 2 ml von Lösung 1 und jeweils 0,5 ml von Lösungen 2, 3 und 4. Davon wurden 50 ml mit aqua dest auf 250 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde alfa benannt. Wir lösten 360 mg Theophyllin, 200 mg Glucose und 200 mg Human Albumin in alfa. Nach Zugabe von 16 ml der zuvor hergestellten Bikarbonat-Lösung füllten wir das Gemisch mit alfa auf 100 ml auf.

200 μ l dieser Lösung, die wir als Assay-Puffer bezeichneten, wurden zu 200 μ l Probe hinzugefügt: das Gesamtvolumen des Inkubationsmediums betrug also 400 μ l. Der Assay-Puffer ist ein modifizierter Krebs-Ringer-Bikarbonat (KRB)-Puffer: Kochsalz wurde eliminiert, Theophyllin, Glucose und Human Albumin hinzugefügt.

2.2.2 Die Proben

Als Proben wurden Human Albumin-Lösung, TSH, normales IgG, MB-IgG, subfraktioniertes IgG und natives Serum eingesetzt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Inkubationsmedium (200 μ l Probe + 200 μ l Assay-Puffer).

2.2.2.1 Human Albumin-Lösung zur Ermittlung der basalen cAMP-Bildung

Die Human Albumin-Lösung bestand aus 0,1% HSA in 0,9% NaCl. Wir bezeichneten die cAMP-Konzentration, die nach Inkubation mit dieser Human Albumin-Lösung (200 μ l Assay-Puffer kamen noch hinzu) ermittelt wurde, als Basalwert.

2.2.2.2 Das Thyrotropin (TSH)

Die oben beschriebene Human Albumin-Lösung wurde zu TSH zugegeben, das wir auf die gewünschte Konzentration verdünnten. Die TSH-Konzentration wurde in mE/ml angegeben.

2.2.2.3 IgG

Normales und MB-IgG wurden durch Fällung mit Ammoniumsulfat und anschließender Ionenaustausch-Chromatographie (44, 52) vom Gesamteiweiß der Seren oder der Plasmaphoresen getrennt. DE-32-Cellulose diente als Ionenaustauscher (4, 52). Die Elektrophorese bestätigte die Reinheit des gewonnenen IgG. Die Ausbeute betrug ca 80% des ursprünglich im Serum oder in der Plasmaphorese enthaltenen IgG. Das gereinigte IgG wurde für unsere Versuche, entsprechend der gewünschten Konzentration, mit 0,9% NaCl verdünnt.

IgG (S) und "pool" IgG negativ (s. 2.1.3) dienten zur Ermittlung des Kontrollwertes, der eine Beurteilung des stimulierenden Effekts von MB-IgG ermöglicht.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Biuretmethode bestimmt.

2.2.2.4 Subfraktioniertes IgG

Das IgG des Menschen ist aus vier Subklassen (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) zusammengesetzt. Morell et al. (39), die das IgG von zwischen 40 und 50 Jahre alten Individuen untersuchten, geben in Prozentzahlen den Anteil jeder Subklasse am gesamten IgG wie folgt an:

IgG₁ 54,8%, IgG₂ 34,5%, IgG₃ 6,9%, IgG₄ 3,8%.

Eine 10 ml Protein A-Sepharose-Säule diente zur Subfraktionierung des IgG, die in Anlehnung an Akyol (3), Witte et al. (58, 59), Duhamel et al. (17) durchgeführt wurde. Die Proteinmenge, die auf eine 10 ml Protein A-Säule aufgetragen wird, darf, wenn die Auftrennung gelingen soll, 40 mg nicht übersteigen.

Akyol (3) und Witte et al. (59) ließen die Zusammensetzung jeder der drei aufgetrennten Fraktionen durch eine nephelometrische Immun-Assay-Methode analysieren. Die einzelnen Fraktionen, die wir später im TSAb-Assay einsetzten, bestehen, wie Tab. 3 zeigt, keineswegs aus nur einer Subklasse; sie stellen lediglich eine Anreicherung der IgG-Subklassen 1 bis 3 dar.

2.2.3 Versuchsablauf

Das Schilddrüsengewebe wurde unmittelbar nach der Operation des Patienten in eiskühler physiologischer Kochsalzlösung zum Labor transportiert. Die porcinen Schilddrüsen wurden ebenfalls sofort ins Labor gebracht. Humanes Schilddrüsengewebe, gleich nach der Operation bei -20°C eingefroren, ließ sich, nachdem es aufgetaut wurde, nicht mehr stimulieren.

Fraktion	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄
I	5,4 %	3,8 %	87,1 %	3,1 %
II	29,7 %	44,0 %	21,0 %	5,0 %
III	56,9 %	27,5 %	9,1 %	6,2 %

Tab. 3

Prozentsatz der Subklassen 1 bis 4 in den drei an der Protein A-Sepharose-Säule aufgetrennten IgG-Fractionen. Gesamt-IgG jeder Fraktion = 100 %.

Dünne Schilddrüsen-Schnitte, mit Hilfe des Mikrotoms gewonnen, wurden in 5 bis 15 mg schwere Stücke geteilt und nach dem Wiegen über zwei Stunden bei 37°C in kleinen Glasgefäßen inkubiert. Das Inkubationsmedium, das mit einem Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ versetzt wurde, bevor wir die Schilddrüsenstücke hineinlegten, bestand aus 200 ul Assay-Puffer und 200 ul Probe.

Nach der zweistündigen Inkubation wurden die kleinen Schilddrüsen-Stücke in 6% Trichloressigsäure, die das Protein fällen und die Reaktion stoppt, homogenisiert und im Kalten (4°C) mit 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand in den Homogenisatoren wurde mit Pasteurpipetten abgehoben, um dann 3 mal in jeweils 5 ml mit Wasser gesättigtem Äther gewaschen zu werden. Die Ätherphase wurde nach dem ersten und nach dem zweiten Waschvorgang 10 Min, nach dem dritten Waschvorgang 15 Min stehengelassen und dann abgesaugt. Die so gereinigte untere Phase, in der das cAMP enthalten war, verdampfte bei 60°C bis 70°C unter Stickstoffbegasung. Die Trockensubstanz, die wir in einem Exsikator aufbewahrten, wurde vor der cAMP-Bestimmung unter Berücksichtigung des ursprünglichen Schilddrüsenengewichtes in aqua dest aufgelöst. Die cAMP-Konzentration wurde mit Hilfe des Radioimmunoassays (RIA) von Becton und Dickinson bestimmt und in p mol cAMP/mg Schilddrüse angegeben. Zur Ermittlung jedes einzelnen cAMP-Wertes dienten drei bis fünf Schilddrüsenstücke, die mit derselben Probe, unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Ergebnisse wurden jedesmal angegeben.

2.3 Radioreceptor-Assay

Der RRA (Radioreceptor-Assay) diente zur Bestimmung der TDA. Dabei wird die Verdrängung des radioaktiv markierten Thyrotropins aus der Bindung an eine Schilddrüsenmembran-Präparation gemessen (3, 59). TDA wurde als Quotient der TSH-Bindung in Gegenwart des Probanden-IgG durch die TSH-Bindung nach Zugabe von Kontroll-IgG in % angegeben, wobei Werte unter 85% als positiv angesehen wurden.

$$TDA = \frac{\text{TSH-Bindung nach Zugabe des Probanden-IgG}}{\text{TSH-Bindung nach Zugabe von Kontroll-IgG}}$$

2.4 Bestimmung der Schilddrüsenhormone und Messung der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium

Nach Fällung des Thyroglobins mit Polyethylenglycol (PEG) wurden die T_3 (Trijodthyronin)- und die T_4 (Thyroxin)-Konzentration im Inkubationsmedium nach einer etablierten Labormethode unter Verwendung der Doppel-Antikörper-Bestimmung gemessen. Für T_3 liegt die untere Nachweisgrenze bei 18,9 ng%, für T_4 bei 0,66 µg %.

Die Glucose wurde mit der Hexokinase-Methode bestimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Stimulation porcinen Gewebes

3.1.1 Einfluß von Kochsalz und Phosphodiesterase-Hemmern im Inkubationsmedium auf die cAMP-Bildung

Zu Beginn unserer Arbeit versuchten wir zu klären, wie die cAMP-Bildung auf unterschiedliche Kochsalzkonzentrationen reagiert.

Die cAMP-Akkumulation im Gewebe erreichte sowohl nach TSH- wie nach MB IgG-Stimulus den höchsten Wert bei einer NaCl-Konzentration im Inkubationsmedium von 0,45 g/dl, die deshalb in den folgenden Versuchen immer bevorzugt wurde. Höhere Kochsalzkonzentrationen zeigten eine hemmende Wirkung, die schon bei 0,9 g NaCl/dl zutage trat. Auf die Beeinflussung der cAMP-Bildung durch unterschiedliche Kochsalzkonzentrationen soll bei Anwendung menschlichen Gewebes unten (s. 3.2.1) nochmals eingegangen werden.

Der Abbau des cAMP erfolgt durch das Enzym Phosphodiesterase. Sowohl Theophyllin als auch das 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (MIX) hemmen die Phosphodiesterase und führen daher zu einer höheren cAMP-Akkumulation. Steigende Konzentrationen des Theophyllins (2,5 mM, 5 mM und 10 mM) gingen mit höheren cAMP-Werten nach TSH-Stimulation einher (keine Abb.). Im selben Assay (die gleiche Schilddrüse) zeigte MIX in drei verschiedenen Konzentrationen (0,5 mM, 1 mM und 2 mM) eine geringere hemmende Wirkung auf die Phosphodiesterase (keine Abb.) als das Theophyllin in den oben angegebenen Konzentrationen: nach TSH-Stimulation wurden niedrigere cAMP-Werte gemessen. Daher wurde in den folgenden Versuchen Theophyllin als Phosphodiesterase-Hemmer angewandt, und zwar in einer Konzentration von 10 mMOL/l.

3.1.2 TSH-Stimulation der cAMP-Bildung

3.1.2.1 Vergleich der cAMP-Akkumulation im Gewebe verschiedener Schilddrüsen nach TSH-Stimulierung

Wir sind der Frage nachgegangen, wie frisches Schilddrüsengewebe verschiedener Schweine aus demselben Schlachthof, unter den gleichen Bedingungen inkubiert, auf die stimulierende Wirkung von bovinem TSH reagiert.

Wie bereits erwähnt, diente eine Human-Albumin-Lösung zur Ermittlung des Basalwertes, der die Bezugsgröße für den Stimulations-effekt von TSH auf die cAMP-Bildung darstellte. Unterschiedliche Human-Albumin-Konzentrationen im Inkubationsmedium (0,75 mg/ml, 1,5 mg/ml und 3 mg/ml) änderten weder den Basalwert noch die cAMP-Konzentration nach TSH-Stimulierung (keine Abb.). Hierdurch konnte eine mögliche Beeinflussung der cAMP-Bildung durch Verunreinigung des Human-Albumins ausgeschlossen werden.

Die Stimulierbarkeit der getrennt präparierten Schilddrüsen zeigte starke Abweichungen, die auch unter Berücksichtigung der variierenden Basalwerte, nämlich bei Angabe der cAMP-Akkumulation in Prozentzahlen des Basalwerts, bestehen blieben (Tab. 4).

Die Ernährung (gesetzlich sind Thyreostatika verboten), das Gebiet, aus dem die Tiere stammen, die verschiedenen Schweinerassen mögen zum Teil die ausgeprägte "interassay Variabilität" erklären. Hinzu kommt, daß die Zeit vom Schlachten des Tieres bis zur Inkubation trotz unserer Bemühungen nicht konstant gehalten werden konnte; Schwankungen von ca. einer Stunde ließen sich nicht vermeiden.

	B ₀	TSH 0,01 mE/ml	TSH 0,1 mE/ml	TSH 0,5 mE/ml	TSH 1 mE/ml
I	0,45 ± 0,07	-	2,18 ± 0,22 (484 %)	-	-
II	0,13 ± 0,02	-	-	1,23 ± 0,52 (946 %)	-
III	0,40 ± 0,05	-	-	3,38 ± 0,8 (845 %)	-
IV	0,10 ± 0,02	-	-	-	0,93 ± 0,1 (930 %)
V	0,48 ± 0,02	0,48 ± 0,02 (100 %)	0,85 ± 0,1 (177 %)	-	3,00 ± 0,25 (625 %)
VI	0,25 ± 0,02	-	-	-	5,60 ± 0,6 (2240 %)

Tab. 4

Stimulation porcinen Schilddrüsengewebes durch TSH.

B₀ : Basalwert

Angabe der cAMP-Werte in $\frac{\text{pmol}}{\text{mg}}$ ± SD

In Klammern: cAMP nach TSH-Stimulierung in Prozentzahlen des Basalwertes

I - VI: Sechs verschiedene Schweineschilddrüsen.

3.1.2.2 Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung nach TSH-Stimulation

Abb. 1 gibt die Abhängigkeit der cAMP-Bildung nach TSH-Stimulation von der Zeit in zwei getrennten Assays wieder.

Die cAMP-Bildung in Schilddrüse 1 (o Sdr 1) ist trotz geringeren Stimulus höher ausgefallen als in Schilddrüse 2 (Δ Sdr 2). Auf die stark abweichende Stimulierbarkeit verschiedener Schilddrüsen wurde bereits unter 3.1.2.1 hingewiesen.

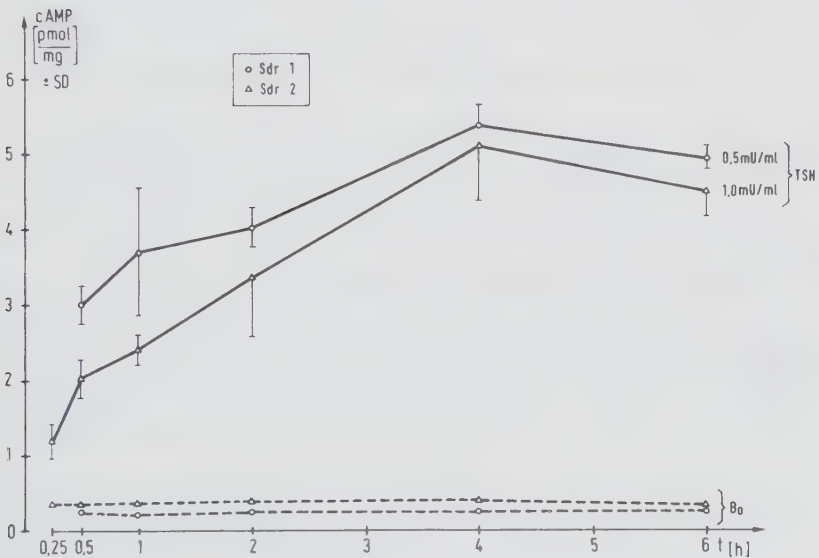


Abb. 1: Zeitabhängigkeit der cAMP-Akkumulation nach TSH-Stimulierung.

Zwei porcine Schilddrüsen (o Sdr 1 und Δ Sdr 2) wurden präpariert und getrennt untersucht. B_0 war der Basalwert, der anhand einer Human-Albumin-Lösung ermittelt wurde.

Im Assay mit Schilddrüse 2 (Δ Sdr 2) betrug die cAMP-Bildung nach der ersten Viertelstunde nur 24 % des maximalen Wertes; zwischen der zweiten und der vierten Stunde nahm sie in beiden Assays stark zu. Der Sechs-Stunden-Wert lag wieder geringfügig unterhalb des maximalen Wertes bei vier Stunden Inkubationszeit.

Ogleich die cAMP-Bildung erst nach vier Stunden den Maximalwert erreichte, haben wir zwei Stunden Inkubationszeit in allen Versuchen vorgezogen; eine längere Inkubationszeit würde die ohnehin sehr lange Zeit, die die Durchführung des TSAb-Assays erfordert (ca. 8 Stunden), noch ausdehnen. Der cAMP-Akkumulation nach Stimulierung mit MBIGG entstand hierdurch kein Nachteil, da sie schon, wie wir später sehen werden, nach zwei Stunden ein Plateau erreichte (vgl. Abb. 3).

3.1.2.3 Dosiswirkungsbeziehung zwischen TSH- und cAMP-Anstieg

In Abb. 2 ist die Abhängigkeit der cAMP-Bildung von der TSH-Konzentration im Inkubationsmedium dargestellt. Eine deutliche Stimulierung läßt sich schon bei einer Konzentration von 0,1 mE TSH/ml erkennen; die Empfindlichkeit des Assays reicht jedoch nicht aus, um den Effekt von 0,01 mE TSH/ml nachzuweisen.

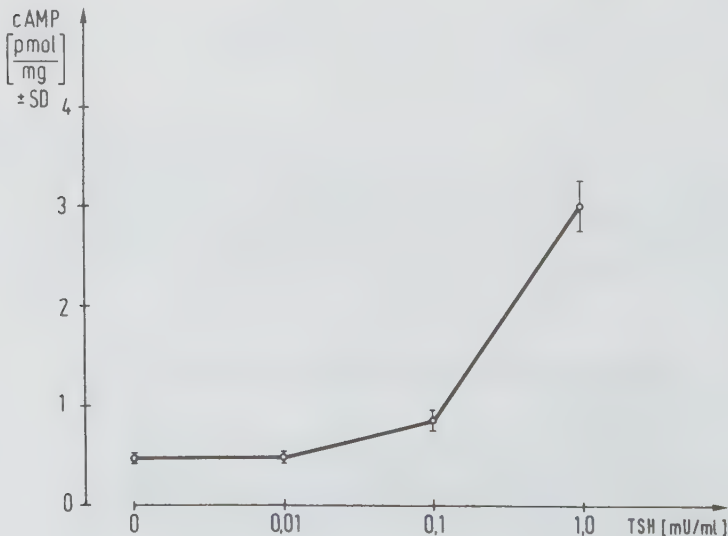


Abb. 2: Dosis-Antwort-Kurve der cAMP-Bildung unter Anwendung procinen Schilddrüsengewebes

3.1.3 Stimulierung der cAMP-Akkumulation durch MB-IgG

3.1.3.1 Vergleich der cAMP-Akkumulation im Gewebe verschiedener Schilddrüsen nach MB-IgG-Stimulierung

Die wichtige Rolle der Immunoglobuline bei der Pathogenese der Hyperthyreose des MB ist in der Einleitung ausführlich besprochen worden. Das MB-IgG rief im TSAb-Assay mit procinem Gewebe eine Stimulierung hervor, sie war jedoch wesentlich geringer als jene Stimulierung, die bei Inkubation mit TSH nachgewiesen wurde. Um die stimulierende Aktivität des MB beurteilen zu können, nahmen wir als Kontrolle sowohl IgG eines negativen "pools" (s. 2.1.3) als auch IgG des Patienten S mit einem AA (s. 2.1.3).

Die "interassay Variabilität" ist nach Stimulation mit MB IgG ähnlich ausgeprägt wie nach Stimulation mit TSH. Sie bleibt, auch wenn die cAMP-Bildung in Prozentzahlen des Kontrollwertes umgerechnet wird, bestehen.

In Tab. 5 haben wir die cAMP-Bildung in verschiedenen Schweinedrüsen angegeben, und zwar sowohl für MB-IgG eines "pools" als auch für TSH. Aus den vorliegenden Werten läßt sich ersehen, daß hohe cAMP-Werte nach TSH-Stimulierung nicht mit hohen cAMP-Werten nach MB IgG-Stimulierung einherzugehen brauchen.

Die Schwierigkeiten, die bei der Interpretation eines Assays wegen der stark abweichenden Stimulierbarkeit verschiedener Schilddrüsen auftreten, sollen, zumal sie uns auch bei der Untersuchung menschlichen Gewebes begegnen werden, erst später besprochen werden.

	Neg. "pool" IgG 10 mg/ml	Pos. "pool" IgG 10 mg/ml	TSH 0,5 mE/ml	TSH 1 mE/ml
I	0,35 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,02 (171 %)	-	3,00 $\pm$ 0,25
II	0,25 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,2 (432 %)	-	4,03 $\pm$ 0,25
III	0,15 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,04 (200 %)	1,23 $\pm$ 0,53	-
IV	0,15 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,04 (153 %)	-	5,60 $\pm$ 0,6
=====				
d	0,10 $\pm$ 0,02	1,9 $\pm$ 0,4 (1900 %)	-	2,5 $\pm$ 0,68

Tab. 5

Stimulierung porcinen Schilddrüsengewebes durch MB-IgG und durch TSH. Vergleich mit humanem Schilddrüsengewebe. Neg. "pool" IgG (s. 2.1.3) als Kontrollwert. Pos. "pool" IgG von MB-Patienten (s. 2.1.3). TDA-Wert zwischen 40 - 60 %. Angabe der cAMP-Werte in $\frac{\text{pmol}}{\text{mg}}$ $\pm$ SD

In Klammern: cAMP nach MB-IgG-Stimulierung in $\frac{\text{mg}}$ Prozentzahlen des Kontrollwerts.

I - IV: Vier verschiedene Schweineschilddrüsen

d: Humanes Schilddrüsengewebe (paranodulär)

Zur Identifikation der Schilddrüsen. Tab. 2.

3.1.3.2 Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung nach MB-IgG-Stimulation

Die Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung von einem "pool" IgG, aus dem Serum mehrerer MB-Patienten, dessen TDA-Wert im Rezeptor Assay zwischen 40 % und 60 % lag, gewonnen, ist in Abb. 3 aufgezeichnet. Nach zwei Stunden erreichte die MB-IgG-stimulierte cAMP-Akkumulation ihren Maximalwert; sie blieb zwischen der zweiten und der sechsten Stunde annähernd gleich. Die cAMP-Bildung bei TSH-Stimulation nahm hingegen zwischen der zweiten und der vierten Stunde stark zu. Eine Verzögerung des Maximalwertes bei MB-IgG-Stimulation gegenüber TSH konnte im Gegensatz zum LATS-Versuch in unserem Assay somit nicht festgestellt werden.



Abb. 3: Zeitabhängigkeit der cAMP-Akkumulation sowohl bei MB-IgG- als auch bei TSH-Stimulierung

Eine einzige Schweineschilddrüse wurde präpariert. Pos. IgG stammte von einem positiven "pool" (s. 2.1.3), der aus den IgG verschiedener MB-Patienten bestand. Neg. IgG stammte von einem negativen "pool" (s. 2.1.3), der aus den IgG verschiedener Personen zusammengesetzt war, bei denen kein Anhalt für das Vorliegen einer immunogenen Hyperthyreose bestand.

TSH wurde in einer Konzentration von 0,5 mE/ml angewandt. Sowohl neg. IgG als auch pos. IgG wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml angewandt. B_0 war der Basalwert, der anhand einer Human-Albumin-Lösung ermittelt wurde.

3.1.3.3 Stimulation durch das IgG vom MB-Patienten (L).
Vergleich mit humanem Gewebe

Die Antwort auf den Stimulus von IgG (L) war bei tierischem Gewebe wesentlich geringer als bei humanem Schilddrüsengewebe (Abb. 4 und 5). Dasselbe galt für pos. "pool" IgG (Tab. 5).

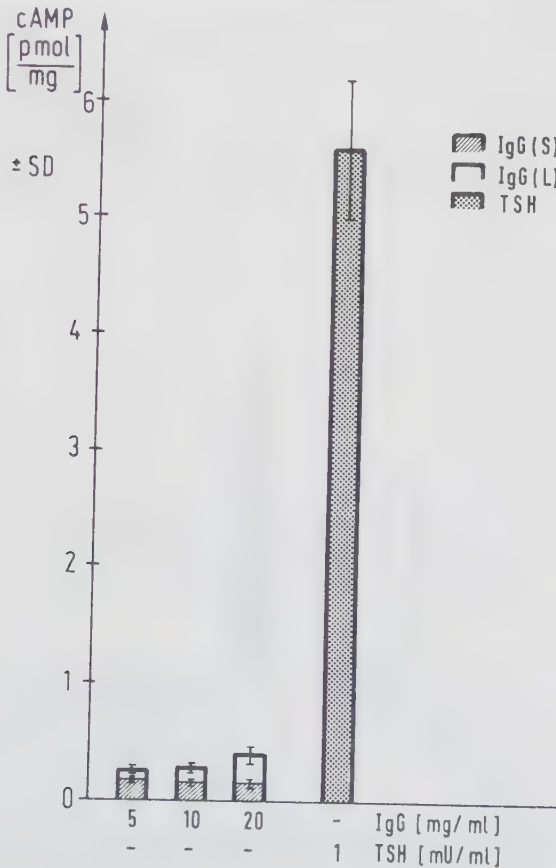


Abb. 4: Stimulierung porcinen Schilddrüsengewebes unter Anwendung einer einzigen Schilddrüse.
IgG (S) von einem AA-Patienten diente als Kontrolle,
IgG (L) war von einem MB-Patienten.

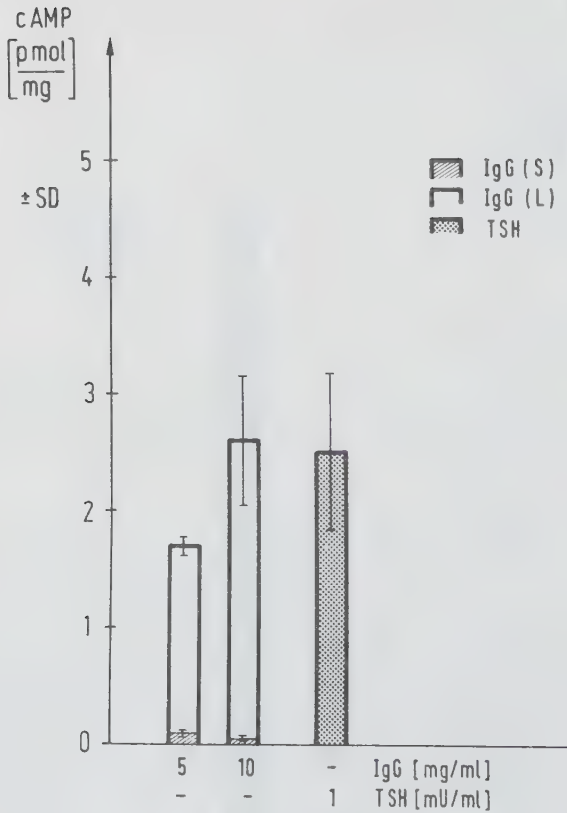


Abb. 5: Stimulierung humanen paranodulärem Schilddrüsengewebes: Schilddrüse (d) wurde präpariert. Zur Identifikation der Schilddrüse s. Tab. 2.
IgG (S) eines AA-Patienten diente als Kontrolle,
IgG (L) war von einem MB-Patienten.

3.2 cAMP-Akkumulation nach Stimulierung humanen Schilddrüsengewebes

Die geringe Stimulierbarkeit der Schilddrüsenschnitten beim Schwein, die auf die Spezifität der MB-Autoantikörper für menschliches Gewebe hindeutet, veranlaßte uns dazu, im weiteren Verlauf der Untersuchungen humane Schilddrüsen anzuwenden.

3.2.1 Einfluß von Kochsalz im Inkubationsmedium auf die cAMP-Bildung

Der Einfluß verschiedener Kochsalzkonzentrationen auf die cAMP-Bildung sowohl nach TSH- wie nach MB-IgG-Stimulierung wurde untersucht (Abb. 6).

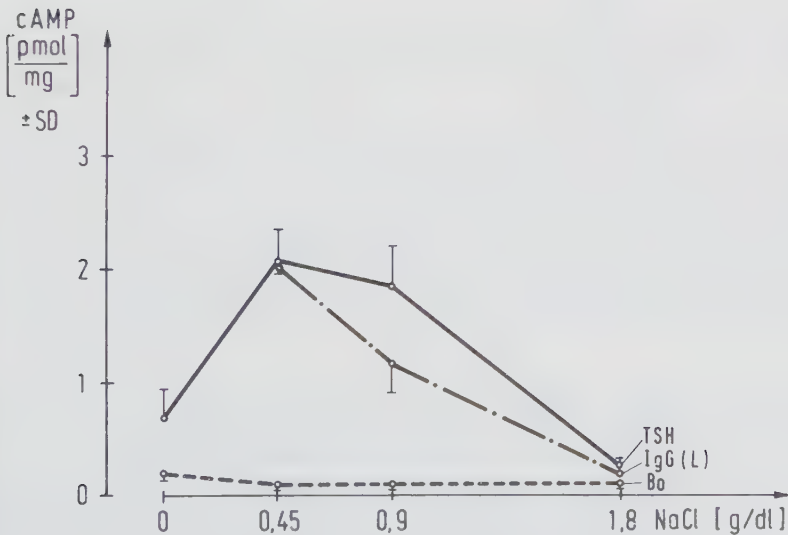


Abb. 6: Einfluß von Kochsalz auf die cAMP-Akkumulation sowohl bei TSH- als auch bei MB-IgG-Stimulierung.

IgG (L) von einem MB-Patienten wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt. TSH wurde in einer Konzentration von 0,5 mE/ml eingesetzt. B_0 war der Basalwert, der anhand einer Human-Albumin-Lösung ermittelt wurde. Schilddrüse (b) wurde präpariert. Zur Identifikation der Schilddrüse s. Tab. 2.

Nach beiden Stimulatoren, TSH und IgG (L), wies die cAMP-Akkumulation bei 0,45 % NaCl im Inkubationsmedium ein Maximum auf. 0,9% NaCl hatte einen inhibitorischen Effekt, der bei MB-IgG-Stimulus ausgeprägter war.

Die Wirkung einer vollständigen Eliminierung von Kochsalz konnte für MB-IgG nicht untersucht werden, da das Protein unter solchen Bedingungen ausfällt. Bei 1,8 % NaCl war die Stimulierbarkeit des cAMP durch TSH und durch MB-IgG aufgehoben.

2.2.2 cAMP-Akkumulation in humanen Schilddrüsen nach TSH-Stimulierung

3.2.2.1 cAMP-Akkumulation nach TSH-Stimulierung im excidierten Gewebe von Patienten mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen

Humanes Schilddrüsengewebe wurde in der Erwartung, daß es sich durch MB-IgG besser stimulieren ließe, angewandt. Einige Nachteile mußten jedoch in Kauf genommen werden: Nicht nur die Beschaffung menschlichen Gewebes bereitet erhebliche Schwierigkeiten; darüber hinaus ist der Funktionszustand des Gewebes je nach Erkrankung des operierten Patienten unterschiedlich. Hauptsächlich wurde paranoduläres Gewebe von Patienten präpariert, die entweder wegen einer euthyreoten Struma nodosa oder wegen eines umschriebenen AA operiert worden waren, zusätzlich Gewebe von zwei MB-Patienten, die zuvor mit Carbimazol behandelt worden waren, und ein entferntes AA.

Die Basalwerte und die Antworten auf TSH-Stimulierung wurden gemessen. Die Basalwerte in Tab. 6 spiegeln den Funktionszustand des Gewebes wider, der offenbar für die stark abweichende Stimulierbarkeit der verschiedenen Schilddrüsen mitverantwortlich ist. Wir fanden im Gewebe operierter MB-Patienten und im AA Adenom die höchsten Basalwerte (Tab. 6).

Im paranodulären Gewebe lag die cAMP-Konzentration nach TSH-Stimulierung, insofern sie in pmol/mg angegeben wurde, meistens unterhalb jener Werte, die bei Anwendung von MB-Gewebe und vom AA ermittelt wurden (Tab. 6). Drückt man hingegen die cAMP-Konzentration in Prozentzahlen des Basalwertes aus, so ergeben sich höhere Werte für paranoduläres Gewebe (Tab. 6).

Humane Schilddrüse	B ₀	TSH 0,1 mE/ml	TSH 0,5 mE/ml	TSH 1 mE/ml	TSH 10 mE/ml
a	0,4 ± 0,2	1,2 ± 0,13 (300 %)	-	4,15 ± 0,25 (1038 %)	-
b	0,1 ± 0,02	-	2,08 ± 0,4 (2080 %)	-	-
c	0,18 ± 0,02	-	-	1,75 ± 0,3 (972 %)	-
d	0,08 ± 0,02	-	-	2,5 ± 0,68 (3125 %)	2,6 ± 0,58 (3250 %)
e	0,38 ± 0,15	-	-	5,2 ± 1 (1368 %)	-
f	0,23 ± 0,05	-	-	3,1 ± 0,65 (1348 %)	-
g	1,1 ± 0,05	-	-	4,0 ± 0,5 (364 %)	6,05 ± 1,15 (550 %)
h	1,03 ± 0,05	-	-	5,3 ± 1 (515 %)	7,25 ± 1,5 (704 %)
i	1,18 ± 0,05	-	6,9 ± 1,4 (585 %)	-	-

Tab. 6

Stimulierung humanen Schilddrüsengewebes durch TSH

B₀: Basalwert

Angabe der cAMP-Werte in $\frac{\text{pmol}}{\text{mg}} \pm \text{SD}$

In Klammern: cAMP nach TSH-Stimulierung in Prozentzahlen des Basalwerts.

a bis f: paranoduläres Schilddrüsengewebe

g und h: MB-Schilddrüsengewebe

i: AA-Gewebe

Zur Identifikation der Schilddrüsen s. Tab. 2.

3.2.2.2 Dosiswirkungsbeziehung zwischen TSH- und cAMP-Anstieg

Einige Autoren (6, 8, 47, 48) stellten eine Abnahme der stimulierenden Wirkung des Thyrotropins fest, wenn es in einer sehr hohen Konzentration eingesetzt wurde. Daher interessierte uns an der Dosiswirkungskurve (Abb. 7) besonders die Antwort auf hohe TSH-Konzentrationen. Bei 100mE TSH/ml ließ sich eine Abnahme der cAMP-Konzentration erkennen. Sowohl eine Verunreinigung, die erst bei sehr hohen TSH-Konzentrationen hervorträte (6) als auch eine negative Kooperativität, die von der Existenz zweier unterschiedlicher Arten von Rezeptoren herrühren würde (47, 48), sind für diese Abnahme verantwortlich gemacht worden.

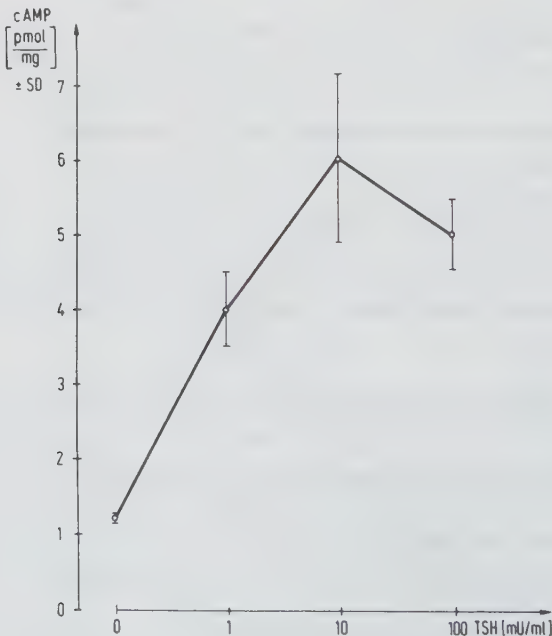


Abb. 7: Dosis-Antwortkurve der TSH-Wirkung auf cAMP-Akkumulation MB-Gewebe (Schilddrüse g) wurde präpariert. Zur Identifikation der Schilddrüse s. Tab. 2.

3.2.3 Stimulation der cAMP-Akkumulation durch MB-IgG

3.2.3.1 cAMP-Bildung nach MB-IgG-Stimulation im excidierten Schilddrüsengewebe von Patienten mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen

Das IgG (L), aus dem Serum eines MB-Patienten präpariert, wies eine hohe biologische Aktivität im TSAb-Assay mit humanem Gewebe auf; seine stimulierende Wirkung trat hier wesentlich stärker hervor als bei Anwendung porcinen Gewebes (vgl. dazu Abb. 4). Schnitte verschiedener Schilddrüsen zeigten stark abweichende Antworten der cAMP-Bildung auf den gleichen Stimulus; dies gilt, auch wenn nur das paranoduläre Gewebe in Betracht gezogen wird (Tab. 7). Die von uns festgestellten Unterschiede blieben, als wir die cAMP-Bildung nach Stimulation in Prozent des gleichfalls stark variierenden Kontrollwerts (normales IgG (S)) umrechneten, bestehen (Tab. 7).

Nach Stimulierung mit IgG war die cAMP-Konzentration im paranodulären Gewebe fast immer niedriger als im MB-Gewebe und im AA. In Prozent des Kontrollwertes ausgedrückt erwies sich jedoch die cAMP-Akkumulation im MB-Gewebe und im AA als wesentlich geringer (Tab. 7). Das bedeutet, daß in funktionell aktivem Gewebe die basale cAMP-Bildung höher lag.

In Einklang mit P. Carayon et al. (11) bemerkten wir bei Anwendung des normalen IgG (S) in der höheren Konzentration, nämlich 10 mg/ml, eine Abnahme des cAMP-Wertes (s. Tab. 7).

Humane Schilddrüse	IgG (S) 5 mg/ml	IgG (S) 10 mg/ml	IgG (L) 5 mg/ml	IgG (L) 10 mg/ml
a	0,3 ± 0,08	-	-	3,2 ± 0,18 (1067 %)
b	0,1 ± 0,02	-	2,05 ± 0,03 (2050 %)	-
c	0,25 ± 0,07	0,18 ± 0,05	1,55 ± 0,4 (620 %)	2,45 ± 0,1 (1361 %)
d	0,1 ± 0,02	0,05 ± 0,01	1,95 ± 0,08 (1950 %)	2,6 ± 0,55 (5200 %)
f	0,25 ± 0,05	-	1,03 ± 0,13 (412 %)	-
g	1,08 ± 0,15	0,85 ± 0,1	2,83 ± 0,6 (262 %)	4,33 ± 0,83 (509 %)
h	0,98 ± 0,15	0,75 ± 0,1	1,55 ± 0,5 (158 %)	-
i	2,68 ± 0,15	-	5,1 ± 1,18 (190 %)	-

Tab. 7

Stimulierung humanen Schilddrüsengewebes durch MB-IgG.

IgG (S) diente als Kontrollwert.

Angabe der cAMP-Werte in $\frac{\text{pmol}}{\text{mg}} \pm \text{SD}$

In Klammern: cAMP nach MB-IgG-Stimulierung in Prozentzahlen des Basalwerts.

a, b, c, d, f: paranoduläres Schilddrüsengewebe

g und h: MB-Gewebe

i: AA-Gewebe

Zur Identifikation der Schilddrüsen s. Tab. 2.

3.2.3.2 Dosiswirkungskurve von IgG eines MB (IgG (L)) bzw. eines autonomen Adenoms (IgG (S)) auf paranoduläres Gewebe

Die Antwort paranodulären Gewebes auf steigende IgG (L)-Konzentrationen wurde in Abb. 8 wiedergegeben. Schon bei 2,5 mg/ml kommt die stimulierende Wirkung dieses hochpotenten IgG deutlich zum Vorschein, während das KontrollIgG (S) keinen Anstieg der cAMP-Akkumulation induziert.

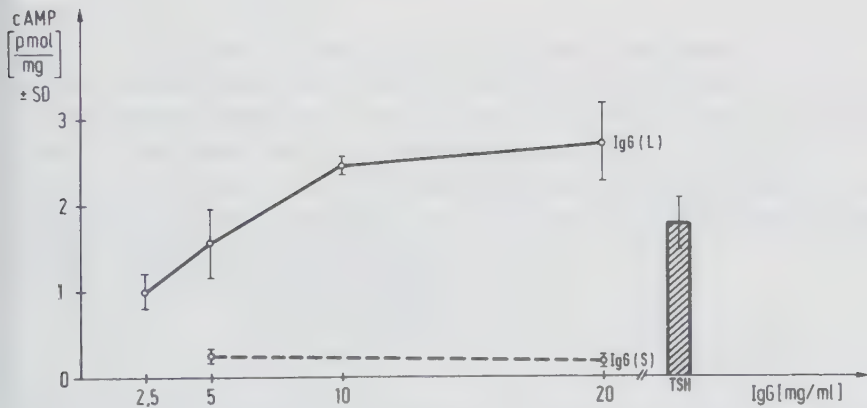


Abb. 8: Dosiswirkungskurve der IgG-Stimulation von cAMP. Paranoduläres Gewebe (Schilddrüse c) wurde präpariert. Zur Identifikation der Schilddrüse s. Tab. 2. Zum Vergleich wurde die stimulierende Wirkung von TSH in einer Konzentration von 1 mE/ml mitbestimmt.

3.2.3.3 Stimulation der cAMP-Bildung durch sechs individuelle MB-IgG und durch positives "pool" IgG. Vergleich mit TDA

Wir untersuchten die cAMP-stimulierende Wirkung von IgG eines positiven "pool" und einzelner MB-Patienten, die im TDA-Assay positive Befunde aufwiesen. Zwei Schilddrüsen wurden präpariert. Die in Tab. 8 und in Tab. 9 angegebenen cAMP-Werte sind jeweils anhand einer einzelnen Schilddrüse ermittelt worden.

Im ersten Versuch (Tab. 8) lag die cAMP-Konzentration nach Inkubation mit IgG (H), aus dem Serum einer MB-Patienten mit einer Orbitopathie gewonnen, unterhalb des Kontrollwertes (normales IgG (S)). Dies könnte auf die Anwesenheit blockierender Antikörper hinweisen. Die anderen MB-IgG riefen unterschiedliche Zunahmen des cAMP hervor. Die Stimulation erreichte in keinem Fall den TSH-induzierten cAMP-Anstieg.

Im zweiten Versuch (Tab. 9) zeigte das IgG (D) einer MB-Patienten mit einer Orbitopathie bei positivem TDA-Befund keine stimulierende Wirkung. Der ermittelte Wert lag sogar unterhalb des Kontrollwertes mit normalem IgG (S). IgG (L) und positives "pool" IgG stimulierten die cAMP-Bildung im selben Assay deutlich (Tab. 9), aber wiederum geringer als TSH.

5 mg/ml	cAMP pmol/mg	TDA
IgG (S)	0,3 $\pm$ 0,08 (100 %)	100 %
IgG (L)	3,2 $\pm$ 0,18 (1067 %)	33,7 %
IgG (A)	0,38 $\pm$ 0,18 (293 %)	49,5 %
IgG (V)	0,9 $\pm$ 0,15 (267 %)	78,3 %
IgG (T)	1,0 $\pm$ 0,15 (333 %)	69,5 %
IgG (H)	0,23 $\pm$ 0,02 (77 %)	79,5 %
=====		
TSH 1 mE/ml	4,15 $\pm$ 0,28 (1383 %)	

Tab. 8

5 mg/ml	cAMP pmol/mg	TDA
IgG (S)	0,1 $\pm$ 0,01 (100 %)	100 %
IgG (D)	0,05 $\pm$ 0,01 (50 %)	34,2 %
IgG (L)	1,95 $\pm$ 0,08 (1950 %)	33,7 %
IgG"pool" pos.	1,9 $\pm$ 0,4 (1900 %)	40-60 %
TSH 1 mE/ml	2,5 $\pm$ 0,68 (2500 %)	

Tab. 9

Tab. 8 und 9:

Stimulierung humanen Schilddrüsengewebes durch MB-IgG und durch TSH. Zudem noch die verdrängende Wirkung (TDA) der MB-IgG im RRA. IgG (S) diente als Kontrollwert (s. 2.1.3)

Angabe der cAMP-Werte in $\frac{\text{pmol}}{\text{mg}}$ $\pm$ SD

In Klammern: cAMP nach MB-IgG-Stimulierung in Prozentzahlen des Kontrollwertes.

Tab. 8:

Paranoduläres Schilddrüsengewebe (a) wurde präpariert. Zur Identifikation der Schilddrüsen s. Tab. 2.

Tab. 9:

Paranoduläres Schilddrüsengewebe (d) wurde präpariert. Zur Identifikation der Schilddrüsen s. Tab. 2.

Eine Korrelation zwischen der stimulierenden und der verdrängenden Aktivität von MB-IgG konnte von uns nicht festgestellt werden (Abb. 9).

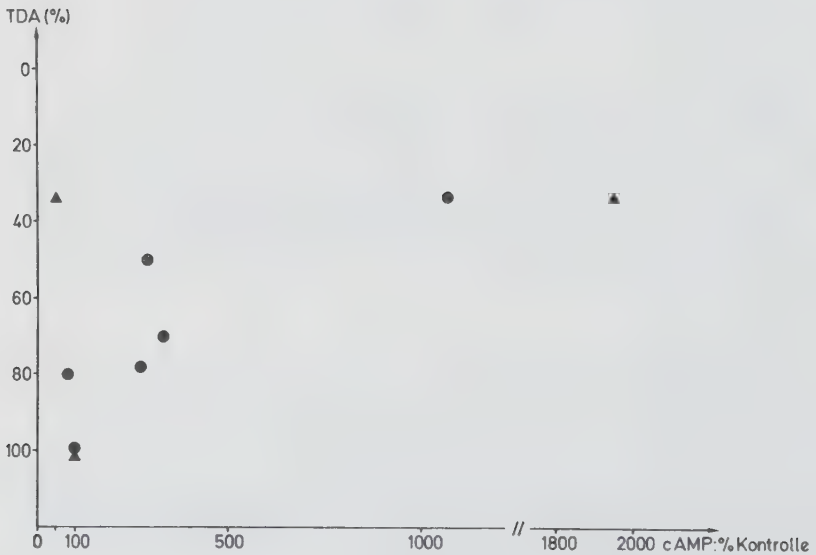


Abb. 9: Vergleich der cAMP-Werte im TSAAb-Assay mit den TDA-Werten im RRA.

Die Werte wurden Tab. 8 (●) und Tab. 9 (▲) entnommen.

3.2.3.4 TSAb-Assay mit MB-IgG am eigenen Gewebe des Patienten

Bei der Patientin H, deren IgG bei Anwendung fremden Gewebes die cAMP-Bildung zu hemmen schien (s. Tab. 8), wurde eine subtotale Strumaresektion durchgeführt. Das excidierte Gewebe wies bei Inkubation mit dem hochpotenten IgG (L) eine deutliche Zunahme der cAMP-Konzentration auf (Abb. 10). IgG (H), das mutmaßlich in vivo für die Hyperthyreose verantwortlich war, rief im eigenen Gewebe keine Stimulation hervor (Abb. 10).

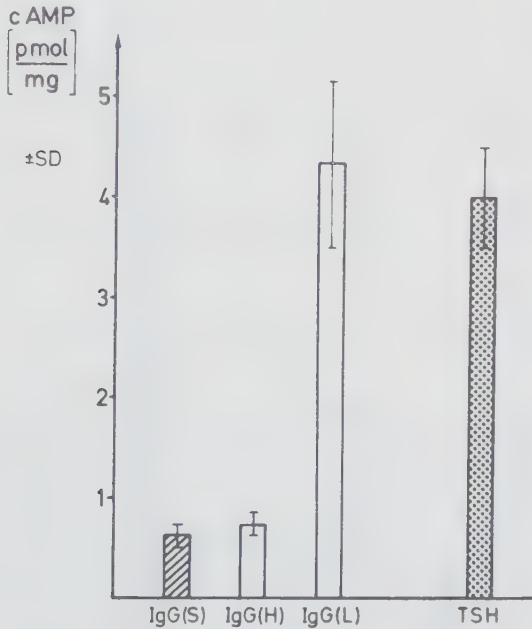


Abb. 10: Stimulation humanen Schilddrüsengewebes durch MB-IgG und TSH.

IgG (S) war von einem AA-Patienten und diente als Kontrolle, IgG (L) und IgG (H) waren von MB-Patienten.

TDA-Werte von IgG (L) und IgG (H) s. Tab. 8.

IgG wurde von einer Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt. TSH wurde in einer Konzentration von 1 mE/ml eingesetzt. Die Schilddrüse der MB-Patientin H wurde präpariert. In Tab. 2 wurde diese Schilddrüse unter g) aufgeführt.

Auch die MB-Patientin T wurde operiert. IgG (T) dieser Patientin konnte, obgleich es in einem früheren Assay eine biologische Aktivität erkennen ließ (Tab. 8), das excidierte eigene Gewebe nicht stimulieren (Abb. 11). Das hochpotente IgG (L) bewirkte eine Zunahme der cAMP-Konzentration; sie war jedoch wesentlich geringer als in anderen Versuchen und lag im Gegensatz zum oben beschriebenen Versuch (Abb. 10) deutlich unterhalb des Wertes, der nach Inkubation mit TSH ermittelt wurde. Eine hohe Empfindlichkeit einer Schilddrüse für TSH geht demnach nicht unbedingt mit einer starken Antwort auf MB-IgG einher.

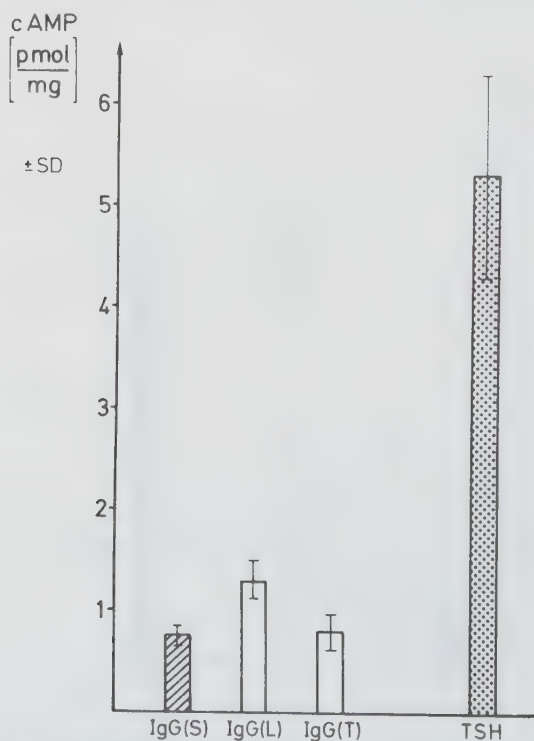


Abb. 11: Stimulation humanen Schilddrüsengewebes durch MB-IgG und TSH.
 IgG (S) von einem AA-Patienten diente als Kontrolle.
 IgG (L) und IgG (T) waren von MB-Patienten.
 TDA-Werte von IgG (L) und IgG (T) s. Tab. 9.
 IgG wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt,
 TSH wurde in einer Konzentration von 1 mE/ml eingesetzt.
 Die Schilddrüse der MB-Patientin T wurde präpariert. In
 Tab. 2 wurde diese Schilddrüse unter h) aufgeführt.

Die Schilddrüsen j, k und l (zu ihrer Identifikation s.Tab. 2), ebenfalls von operierten MB-Patienten, ließen sich in vitro weder durch das eigene IgG noch durch das fremde hochpotente IgG (L) stimulieren: auch TSH induzierte keinen Anstieg des cAMP.

Alle MB-Patienten, deren excidiertes Gewebe wir für unsere Assays präparierten, wurden vor der Operation mit Carbimazol thyreostatisch behandelt und waren zum Zeitpunkt der Operation euthyreot. Die Therapiedauer mit Carbimazol und der Zeitraum zwischen der Diagnose und der Operation waren sowohl bei den Schilddrüsen, die sich stimulieren ließen, als auch bei den Schilddrüsen, die keinen Anstieg nach Stimulation zeigten, unterschiedlich, d.h., beide Gruppen enthielten sowohl Patienten mit relativ langem (1-3 Jahre) als auch solch mit kurzen (3 Monate) Krankheitsverlauf.

Mit Ausnahme der Patientin H wurden alle MB-Patienten präoperativ mit Jodid behandelt. Sämtliche Probanden waren im TDA-Assay deutlich positiv.

3.2.3.5 Kombination verschiedener IgG bzw. IgG plus TSH

Verschiedene Proben, zuvor einzeln untersucht, wurden kombiniert. Der Versuch, dessen Ergebnisse in Abb. 12 dargestellt sind, hatte als Ziel, die Auswirkung dieser Kombination auf die cAMP-Bildung zu bestimmen. Es sei daran erinnert, daß IgG (D) aus dem Serum einer MB-Patientin mit einer Orbitopathie in vitro keine stimulierende Aktivität zeigte (s. Tab. 9). Sein möglicher Einfluß sowohl auf die TSH- wie auf die IgG (L)-Stimulation sollte uns helfen, die funktionellen Eigenschaften näher zu charakterisieren. Auch in diesem Assay, der anhand präparierten AA-Gewebes durchgeführt wurde, ließ IgG (D) im Vergleich zu normalem IgG (AA) eine geringe inhibitorische Wirkung erkennen (Abb. 12, Mitte). TSH und IgG (L) stimulierten einzeln die cAMP-Bildung; die Kombination von beiden zeigte eine additive Wirkung (Abb. 12, links).

Bei gleichzeitiger Applikation von TSH und Kontroll-IgG (S) war die cAMP-Akkumulation geringer als bei alleiniger TSH-Applikation. Verglichen mit normalem IgG (S) war die inhibitorische Wirkung des IgG (D) bei Kombination mit Thyrotropin nur angedeutet nachweisbar.

Normales IgG (S) hatte aber, im Gegensatz zu IgG (D), keinen Einfluß auf die IgG (L)-Stimulation von cAMP (Abb. 12, rechts). IgG (D) hemmte dagegen die biologische Aktivität des hochpotenten IgG (L); zudem reduzierte sich die cAMP-Akkumulation gering, als wir IgG (D) zu IgG (S) hinzufügten.

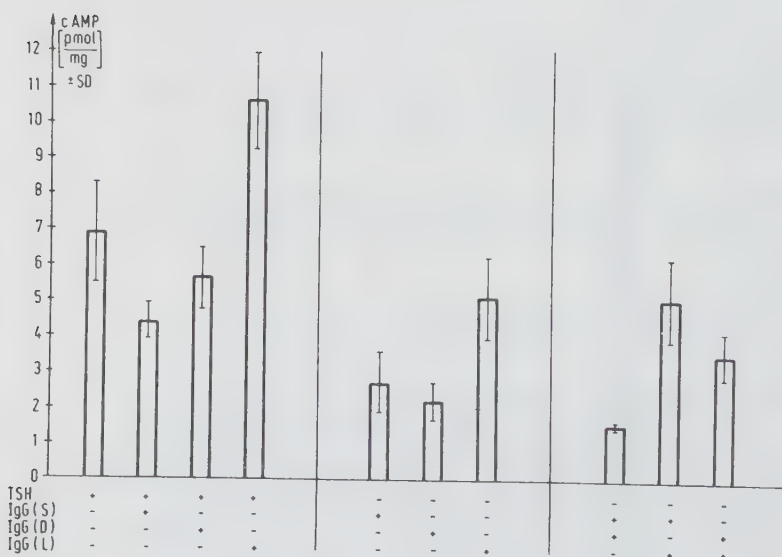


Abb. 12: cAMP-Antwort bei Stimulation durch IgG plus TSH bzw. Mischung verschiedener IgG

Kombination verschiedener Proben. IgG (S) war von einem AA-Patienten, IgG (D) und IgG (L) waren von MB-Patienten. TSH wurde in einer Konzentration von 0,5 mE/ml eingesetzt, jedes einzelne IgG wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt. Bei Zugabe von zwei verschiedenen IgG ergab sich eine Endkonzentration von 10 mg/ml. AA-Gewebe von Schilddrüse (i) wurde präpariert. Zur Identifikation der Schilddrüse s. Tab. 2.

3.2.3.6 Stimulation der cAMP-Bildung durch an Protein A-Sepharose subfraktioniertes MB-IgG

In einem TSAb-Assay (Tab. 10) untersuchten wir, ob in einer der drei IgGFractionen, die durch Auftrennung über die Protein A-Säule gewonnen wurden, eine Zunahme der biologischen Aktivität (cAMP-Produktion) gegenüber GesamtIgG hervortritt. Die Zusammensetzung der Fraktionen wurde in Tab. 3 angegeben. IgG (D) und IgG (L), beide aus dem Serum von MB-Patienten gewonnen, und Normal-IgG (S), dessen Fraktionen eine Vergleichsmöglichkeit bieten sollten, wurden über Protein A aufgetrennt. Gesamt-IgG und TSH dienten als Kontrollen.

Im RRA wurde die TSH-verdrängende Wirkung sowohl der einzelnen Fraktionen als auch des Gesamt-IgG gemessen. In Klammern geben wir die TSH-verdrängende Aktivität der verwendeten Fraktionen an; der Buchstabe in der 1. Spalte identifiziert den Patienten, dessen Gesamt-IgG subfraktioniert wurde (Tab. 10).

Fraktion I des IgG (S) zeigte unerwarteterweise sowohl eine cAMP-stimulierende als auch eine TSH-verdrängende Wirkung, deren Ursache nicht geklärt werden konnte.

IgG (D), das im RRA einen deutlich positiven Befund aufwies (s. Tab. 9), wurde im vorliegenden TSAb-Assay in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, und zwar 3 mg/ml und 10 mg/ml. Es rief in vitro abermals keine eindeutige Stimulation der cAMP-Bildung hervor. Bei 10 mg/ml lag die cAMP-Konzentration (Wert nicht angegeben) geringfügig unterhalb des Kontrollwertes und somit niedriger als bei 3 mg/ml. Fraktion II des IgG (D), das von den drei Fraktionen im RRA die schwächste Verdrängung radioaktiven TSH zeigte, ließ im TSAb-Assay eine geringe stimulierende Wirkung erkennen, während die Fraktionen I und III mit deutlich positivem TDA keine Stimulation der cAMP-Antwort hervorriefen.

Patient	Gesamt-IgG	F r a k t i o n e n		
		I	II	III
S	0,4 $\pm$ 0,13 (TDA:100 %)	0,83 $\pm$ 0,15 (TDA:72,3 %)	0,5 $\pm$ 0,13 (TDA:100 %)	0,45 $\pm$ 0,1 (TDA:89,4 %)
D	0,53 $\pm$ 0,1 (TDA:34,2 %)	0,7 $\pm$ 0,13 (TDA:57 %)	0,88 $\pm$ 0,33 (TDA:91 %)	0,56 $\pm$ 0,1 (TDA:34,9 %)
L	3,95 $\pm$ 0,7 (TDA:33,7 %)	3,3 $\pm$ 1,58 (TDA:59,5 %)	1,15 $\pm$ 0,7 (TDA:78,2 %)	4,25 $\pm$ 0,8 (TDA:29,2 %)
TSH 1 mE/ml		5,2 $\pm$ 1		

Tab. 10

Stimulierung humanen Schilddrüsengewebes durch Gesamt- und durch subfraktioniertes IgG.

In Klammern: die verdrängende Wirkung der Proben im RRA (TDA) IgG wurde in einer Konzentration von 3 mg/ml eingesetzt.

D und L: MB-Patienten

S: Patient mit einem AA (Kontrolle)

Angabe der cAMP-Werte in $\frac{\text{pmol}}{\text{mg}}$ $\pm$ SD

Paranoduläres Schilddrüsengewebe (e) wurde präpariert.

Zur Identifikation der Schilddrüsen s. Tab. 2.

Gesamt-IgG (L) induzierte eine kräftige cAMP-Stimulation und Verdrängung von TSH. Diese Aktivitäten blieben in den Fraktionen I deutlich, in Fraktion II geringer ausgeprägt erhalten.

Von den drei aufgetrennten Fraktionen des IgG (L) wies Fraktion III die höchste stimulierende und TSH-verdrängende Aktivität auf, die in etwa den Aktivitäten des Gesamt-IgG (L) entsprachen.

3.2.4 Untersuchung des Inkubationsmediums

3.2.4.1 Vergleich der cAMP-Antwort auf Stimulation durch TSH und MB-IgG im Gewebe und im Inkubationsmedium

Eine deutliche Zunahme des cAMP im Medium könnte, sofern diese mit der cAMP-Stimulierung im Gewebe korreliert, die Extraktion des cAMP überflüssig machen. Aus der Höhe des im Medium gemessenen cAMP könnte auf das im Gewebe gebildete cAMP rückgeschlossen werden.

Das cAMP im Medium wurde gemessen und in p mol/mg Schilddrüse auf das Gewicht des eingesetzten Schilddrüsengewebes bezogen. Zusätzlich wurde die Konzentration in p mol/100 μ l Medium angegeben und verglichen mit der cAMP-Akkumulation im Schilddrüsengewebe (Tab. 11).

cAMP im Gewebe war durch TSH und MB-IgG (L) nicht durch Kontroll-IgG (S) stimulierbar. Im Medium nahm die cAMP-Konzentration parallel, aber deutlich geringer als im Gewebe zu. Bezogen auf das inkubierte Schilddrüsengewebe war der cAMP-Gehalt im Medium jedoch geringer stimulierbar, der Stimulationseffekt von 0,1 mE TSH/ml war nicht signifikant.

	Gewebe	Inkubationsmedium	
	cAMP pmol/mg	cAMP pmol/mg	cAMP pmol/100 ul
Basalwert	$0,39 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0$
TSH $\frac{0,1 \text{ mE}}{\text{ml}}$	$1,21 \pm 0,13$	$0,47 \pm 0,19$	$0,73 \pm 0,08$
TSH $\frac{1 \text{ mE}}{\text{ml}}$	$4,16 \pm 0,25$	$0,63 \pm 0,09$	$1,1 \pm 0,14$
IgG (S) $\frac{10 \text{ mg}}{\text{ml}}$	$0,29 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,12$	$0,76 \pm 0,09$
IgG (L) $\frac{10 \text{ mg}}{\text{ml}}$	$3,08 \pm 0,18$	$0,77 \pm 0,16$	$1,30 \pm 0,12$

Tab. 11

Vergleich des cAMP im Gewebe und im Inkubationsmedium.
Angabe der cAMP-Werte in $\frac{\text{pmol}}{\text{mg}}$ und in $\frac{\text{pmol}}{100 \text{ ul}}$

Paranoduläres Schilddrüsengewebe (a) wurde präpariert.
Zur Identifikation der Schilddrüsens. Tab. 2.

3.2.4.2 Verhalten der Schilddrüsenhormone (T_3 und T_4) und Glucose im Inkubationsmedium

Die T_3 - und T_4 -Konzentration im Inkubationsmedium zeigten weder nach TSH- noch nach MB-IgG-Stimulierung eine Zunahme; sie lagen jedes Mal an der unteren Nachweisgrenze (s. 2.4). Dies deutet darauf hin, daß zwar die Aktivierung des "second messengers" in vitro stattfinden kann, aber die Hormonsynthese unter diesen Versuchsbedingungen nicht stimuliert wird.

Ein Glucoseverbrauch konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2.5 Vergleich der Stimulierbarkeit der cAMP-Bildung durch natives Serum und präpariertes IgG von Basedow-Patienten

Das unpräparierte Serum von MB-Patienten ließ eine stimulierende Aktivität erkennen, die jedoch viel geringer war als die Aktivität des mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie gereinigten IgG (Tab. 12).

Humane Schilddrüse	Serum neg.	cAMP pmol mg	Serum pos.	cAMP pmol mg	MB-IgG	cAMP pmol mg
e	G	0,3 ± 0,15	L	0,95 ± 0,01	L 10 mg/ml	4,13 ± 1,38
f	G	0,25 ± 0,05	L	0,93 ± 0,3	L 20 mg/ml	2,48 ± 0,35
g	S	0,7 ± 0,18	N	1,68 ± 0,48	-	-

Tab. 12

Stimulierung humanen Schilddrüsengewebes durch Serum von MB-Patienten. Vergleich mit MB-IgG-Stimulation.

Serum negativ: Serum von Patienten, bei denen kein Anhalt für das Vorliegen eines MB bestand.

Zur Identifikation der Patienten s. 2.1.3

Serum positiv: Serum von MB-Patienten.

Zur Identifikation der Patienten s. 2.1.3

e und f: paranoduläres Gewebe

g: MB-Gewebe

Zur Identifikation der Schilddrüsen s. Tab. 2.

4. DISKUSSION

Bei Verwendung von porcinem Gewebe fielen trotz gleicher Inkubationsbedingungen die variierenden Basalwerte und die stark abweichende Stimulierbarkeit von cAMP der getrennt präparierten Schilddrüsen auf. Dies wurde später, bei Anwendung humanen Gewebes ebenfalls beobachtet. Bidey et al. (8), die gesundes Gewebe von Patienten angewandt haben, bei denen eine Laryngektomie durchgeführt wurde, stellten ähnliches fest: die Antworten auf die gleiche MB-IgG-Präparation schwankten für die verschiedenen Schilddrüsen zwischen 1,0 und 11,0 pmol cAMP/mg Schilddrüse.

In Übereinstimmung mit Kuzuya et al. (29) und Kasagi et al. (22) fanden wir im Gewebe operierter MB-Patienten und im AA höhere Basalwerte des cAMP als im paranodulären Gewebe. Zudem lag in diesen Geweben die cAMP-Konzentration sowohl nach TSH- als auch nach MB-IgG-Stimulation meistens oberhalb derjenigen Werte, die bei Anwendung paranodulären Gewebes ermittelt wurden. Drückt man hingegen die cAMP-Konzentration in Prozentzahlen des Basalwertes aus, so ergeben sich höhere Werte für paranoduläres Gewebe, d.h., die Stimulierbarkeit nicht-aktivierten Gewebes ist größer. Kuzuya et al (29) gelangten zu ähnlichen Resultaten.

Unsere Ergebnisse machen deutlich, daß die biologische Aktivität eines MB-IgG in vitro nicht aus einem einzelnen, in einem Assay gemessenen cAMP-Wert abgelesen werden kann. Sie läßt sich wegen der schlechten Reproduzierbarkeit des Assays bestenfalls aus dem Vergleich mit anderen stimulierenden IgG innerhalb desselben Versuchs abschätzen. Daher empfiehlt es sich, in jedem Versuch die stimulierende Wirkung eines schon bekannten hochpotenten IgG (in unserem Fall IgG (L)) als Vergleichs-IgG mitzubestimmen.

Physiologische Kochsalz-Konzentrationen unterdrückten die cAMP-Bildung sowohl nach TSH- wie nach MB-IgG-Stimulation; im letzten Fall kam jedoch eine noch stärkere inhibitorische Wirkung des Kochsalz zutage. Kasagi et al. (23) postulierten auf Grund dieser Befunde, daß unterschiedliche Interaktionen beider Stimulatoren an gleichen oder benachbarten Rezeptoren stattfinden. Die Dissoziation der Antworten des gleichen Gewebes auf TSH und auf MB-IgG, die bereits oben erwähnt wurde, unterstützt ebenfalls diese Annahme.

Eine hohe Empfindlichkeit des humanen Gewebes für TSH geht nicht unbedingt mit einer hohen Empfindlichkeit für MB-IgG einher. Dieser Befund scheint darauf hinzudeuten, daß die Interaktion beider Stimulatoren mit der Zellmembran nicht nach demselben Muster abläuft.

Nach vierstündiger TSH-Stimulation haben wir in porcinem Gewebe die höchste cAMP-Konzentration gemessen. Wir konnten demnach die Ergebnisse von McKenzie et al. (37) nicht bestätigen, die schon nach 7 min Inkubationszeit eine annähernd maximale cAMP-Akkumulation beobachteten; diese Autoren haben allerdings menschliches Gewebe angewandt und eine wesentlich höhere TSH-Konzentration gewählt (50 mE TSH/mg Schilddrüse).

Bei Stimulation porcinen Gewebes durch MB-IgG erreichte die cAMP-Bildung nach der zweiten Stunde ihren Maximalwert. McKenzie und Zakarija kamen bei Anwendung von Hunde- und Meerschweinchen-Schilddrüsen zu ähnlichen Ergebnissen (37). In Analogie zum LATS-Versuch fanden McKenzie und Zakarija gegenüber der TSH-Stimulation eine Verzögerung der Maximalantwort von cAMP bei MB-IgG-Stimulation und folgerten daraus, daß TSH schneller an die Rezeptoren gebunden wird (37). Die Verzögerung des Maximums nach MB-IgG-Stimulierung konnte, wie oben erwähnt, von uns nicht beobachtet werden: die cAMP-Bildung erreicht nach TSH-Stimulation erst nach vier Stunden ihren Maximalwert.

Bei den Untersuchungen von Bidey et al. (7) lag die cAMP-Akkumulation im Medium nach TSH-Stimulierung 20% - 30% über der cAMP-Akkumulation im Gewebe.

In einer weiteren Arbeit beobachtete dieselbe Gruppe nach Stimulation von Schnitten mit MB-IgG eine Korrelation zwischen dem cAMP im Medium und im Gewebe (8). Die cAMP-Akkumulation im Medium, bezogen auf die Menge inkubierten Gewebes, zeigte eine deutliche Stimulation, obgleich sie diesmal im Gewebe höher war.

Als wir das cAMP im Medium nach Stimulation auf pmol/mg des inkubierten Schilddrüsengewebes umrechneten, ließ sich im Medium, trotz starker cAMP-Antwort im Gewebe auf den Stimulus, keine deutliche Zunahme des cAMP erkennen. Somit bot die Messung des cAMP im Medium keine Alternative für die Messung des cAMP im Gewebe.

Die geringe Inzidenz LATS-positiver Befunde bei klinisch gesichertem MB (ca 50%, s. Tab. 1) rührt wahrscheinlich von der Spezifität stimulierender Antikörper für humanes Gewebe her (37,61). Auch unsere Ergebnisse sind mit der Vorstellung vereinbar, daß die Stimulation von Schweineschilddrüsen eine Kreuzreaktion des humanen MB-IgG mit dem Receptor-Antigen des Tieres widerspiegelt; das pathologische IgG ruft jedoch im tierischen Gewebe einen geringeren Stimulationseffekt hervor als im homologen. Daher postulierte Davies: "Autoantibodies to the Human Thyrotropin Receptor Are Not Species Specific" (14). Die Spezifität der Autoantikörper ist offenbar für die Stimulation der Folgereaktion bedeutsamer als für die Bindung an den Hormonreceptor, da nach Untersuchungen von Davies (14) die Receptorbindung von IgG an menschliche und porcine Membranen ähnlich ist.

Über die Frage, ob die Autoantikörper beim MB monoklonalen oder polyklonalen Ursprungs sind, wurde mehrfach diskutiert (s. 1.5). In jüngerer Publikation scheint sich die Erkenntnis durchzusetzen,

daß im Serum von MB-Patienten polyklonale Antikörper vorliegen, die keine funktionelle Einheit bilden, sondern vielmehr unterschiedliche, z.T. antagonistische Wirkungen aufweisen.

Von den sechs MB-IgG, die wir untersuchten, zeigten vier eine stimulierende Wirkung. Da die beiden nicht stimulierenden MB-IgG TSH-verdrängende Aktivität besaßen, könnte vermutet werden, daß in vitro blockierende Antikörper die Stimulatoren daran hindern, an den Receptor zu binden und ihre Information zu übergeben. Daß bei der immunogenen Hyperthyreose neben den cAMP-stimulierenden Antikörpern ander Antikörper beobachtet wurden, die den Stimulations-effekten entgegenwirkten, wurde in der Einleitung besprochen; diese könnten unter Umständen die hier vorgelegten Befunde erklären.

Im gleichen Sinne zu interpretieren ist die hier gezeigte fehlende Korrelation zwischen verdrängender und cAMP-stimulierender Aktivität, die von anderen Autoren postuliert wurde (10, 40).

Die Protein A Sepharose-Chromatographie wurde in der Erwartung durchgeführt, daß stimulierende und blockierende Antikörper sich unterschiedlich auf die eluierten Fraktionen verteilen; demnach könnte die erhöhte biologische Aktivität einer Fraktion sowohl von der Anreicherung stimulierender als auch von der Eliminierung blockierender Antikörper herrühren.

Wir fanden ein IgG, das TDA, aber keine stimulierende Aktivität zeigt (IgG (D)). Die Fraktion II dieses IgG zeigte dagegen eine geringe Stimulation von cAMP. Sie koinzidierte mit der schwächsten Verdrängung im RRA. Angesichts dieser Ergebnisse könnte vermutet werden, daß in Fraktion II dieses IgG der Einfluß blockierender Antikörper zumindest teilweise ausgeschaltet wurde; die stimulierenden Antikörper kämen dann eher zur Wirkung. Im Gegensatz dazu hatte die Fraktion II des hochpotenten IgG (L) gegenüber den anderen Fraktionen und dem Gesamt-IgG die schwächste biologische Aktivität.

Die Tatsache, daß die cAMP-Bildung nach Inkubation mit Gesamt-IgG (D) in einer Konzentration von 3 mg/ml höher lag als nach Inkubation mit demselben IgG in einer Konzentration von 10 mg/ml, scheint die Annahme, daß hier blockierende Antikörper anwesend sind, zu bestätigen: nach Verdünnung wäre ihre blockierende Wirkung teilweise aufgehoben.

Es sei daran erinnert, daß ein von Zakarija et al. untersuchtes IgG erst nach Verdünnung eine biologische Aktivität erkennen ließ, die bei höheren Konzentrationen verborgen blieb (64). Als Erklärung wurde eine Verdünnung der blockierenden Antikörper vorgeschlagen, die nicht mehr Wirkung stimulierender Antikörper verhindern könnten (64).

Akyol (3) und Witte (58, 59) fanden in Fraktion III, die ebenfalls unter Anwendung einer Protein A Separose-Säule vom Gesamt-IgG verschiedener MB-Patienten getrennt wurde, eine Anreicherung der verdrängenden Aktivität (TDA). Durch Protein A-Separose-Chromatographie und anschließende Affinitäts-Chromatographie mit Antiseren gegen IgG₂ und IgG₄ gelang es Zakarija (63), reines IgG₁ zu gewinnen: fast die gesamte biologische Aktivität eines aufgetrennten MB-IgG wurde in dieser Subklasse wiedergefunden.

Im Gegensatz hierzu ließ in unserem Assay Fraktion III des IgG (L), die allerdings zu ca 56,9% aus IgG₁ besteht, keine Zunahme der biologischen Aktivität gegenüber Gesamt-IgG erkennen. Eine Anreicherung stimulierender Antikörper nach Subfraktionierung des hochpotenten IgG (L) an der Protein A-Sepharose-Säule gelang demnach nicht.

Fraktion I des aktiven IgG (L) stimulierte die cAMP-Bildung deutlich. Dies widerspricht den Ergebnissen von Zakarija, die auch die biologische Aktivität dieser ersten Fraktion untersucht hat (63), ohne jedoch eine Stimulation feststellen zu können. Ochi et al. fraktionierten LATS-IgG von vier Patienten mit Hilfe der Protein A-Säule: Fraktion I zeigte nur in zwei Fällen eine geringe LATS-Aktivität (43).

Zur weiteren Differenzierung der Funktion der MB-IgG wurde die Interaktion der Antikörper untereinander und mit TSH untersucht. Die Kombination von TSH mit einem hochpotenten MB-IgG, nämlich dem IgG (L), zeigte eine additive Wirkung auf die cAMP-Bildung; gleichartige Befunde wurden früher von Holmes et al. (20) und Orgiazzi et al. (47) beschrieben. Orgiazzi et al. (47) beschrieben eine Hemmung des TSH-Effekts durch normales IgG - ein Befund, der in unserem Testsystem ebenfalls auftrat.

Eine inhibitorische Wirkung von MB-IgG auf die maximale TSH-Stimulation von Schnitten, die aus einem AA stammten, wurde von Holmes et al. beschrieben (20). Orgiazzi et al. (47) fanden zwei MB-IgG, die selbst keine Stimulation hervorriefen, jedoch die biologische Aktivität hochpotenter MB-IgG hemmten. Eines dieser MB-IgG zeigte keine inhibitorische Wirkung auf die TSH-Stimulation (47). In unserem Versuch entfaltete das IgG (D), das keine Stimulation von cAMP in vitro hervorrief, eine stärkere inhibitorische Wirkung auf die Wirkung des IgG (L) als auf die von Thyrotropin. Dies könnte darauf hinweisen, daß die Interaktionen des MB-IgG an der Schilddrüsen-Zellmembran nicht nach demselben Mechanismus ablaufen. Die hemmende Wirkung des IgG (D), das möglicherweise die Rezeptoren für MB-IgG blockiert, könnte deshalb bei Kombination mit IgG (L) deutlicher zum Vorschein kommen.

In zwei unter 3.2.3.4 beschriebenen Untersuchungen rief das MB-IgG im eigenen Gewebe keine Stimulation hervor. Dasselbe Gewebe ließ sich indes sowohl durch TSH als auch durch ein fremdes MB-IgG stimulieren, war also nicht refraktär. Lägen beim MB verschiedener Individuen Antikörper gegen identische Determinanten des TSH-Rezeptorproteins vor, so wäre nicht zu erklären, warum sie das eigene Gewebe nicht stimulieren, obwohl Membranreceptoren die Botschaft fremder MB-IgG vermitteln können. Man könnte demnach annehmen, daß individuelle MB-IgG in unterschiedlicher Weise am Membranprotein die Thyreozyten angreifen.

Als weitere Erklärungsmöglichkeit könnte die Besetzung der Receptoren des excidierten Gewebes durch eigene blockierende Antikörper dienen, die möglicherweise schon in vivo an die Zellmembran gebunden haben. Dagegen spricht, daß fremdes hochpotentes IgG offensichtlich seine Information übergeben kann: es kam zu einem deutlichen cAMP-Anstieg.

Bei der Patientin H, deren Gewebe durch fremdes aktives IgG stimuliert wurde, bestand die immunogene Hyperthyreose zum Zeitpunkt der Operation länger als bei der Patientin T, die auf dieses IgG nicht reagierte. Zudem wurde die erst Patientin vor der Operation länger mit Carbimazol behandelt als die zweite. Carbimazol und die längere Dauer der Erkrankung scheinen demnach nicht zu einer Aufhebung der Stimulierbarkeit des Gewebes in vitro zu führen.

Wir wollen noch hinzufügen, daß die Patientin T, in deren excidiertem Gewebe nach Stimulation mit dem aktiven IgG (L) kein cAMP-Anstieg gemessen werden konnte, bei erhaltener TSH-Antwort, im Gegensatz zu der Patientin H vor der Operation mit Jodid behandelt wurde. Bei drei weiteren Patienten mit unterschiedlich langem Krankheitsverlauf unter antithyreoidaler Therapie und präoperativer Jodtherapie war weder nach TSH- noch nach IgG-Stimulation eine cAMP-Akkumulation zu verzeichnen. Die Frage, ob die präoperative

Behandlung mit Jodid zu einem Verlust der Stimulierbarkeit des Schilddrüsengewebes in vitro führt, kann nur von weiteren Versuchen beantwortet werden.

Gossage et al., die die TSH-verdrängende Aktivität mittels Radio-receptortest untersuchten (19), fanden, daß die TSH-verdrängende Wirkung von MB-IgG am eigenen Gewebe nicht größer ist als an fremdem Gewebe; sie sehen darin einen Hinweis dafür, daß die Receptoren für TSH und MB-IgG nicht identisch seien.

Die Dissoziation der Antworten des gleichen Gewebes auf TSH und MB-IgG und die abweichende inhibitorische Wirkung des Kochsalzes auf die Aktivität der beiden Stimulatoren unterstützen diese Annahme.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das hypophysäre TSH stimuliert in vivo die Hormonbiosynthese und die Sekretion der Schilddrüse. Beim MB, einer Autoimmunerkrankung, treten funktionsstimulierende Antikörper im Blut auf und ahmen die Wirkung des TSH auf die Schilddrüsenzelle nach, ohne jedoch einem Regulationsmechanismus unterworfen zu sein: Die Schilddrüse wird demnach zu einer Überfunktion angeregt. Sowohl TSH als auch die Schilddrüsen-stimulierenden Autoantikörper lösen als erste Folgereaktion die Aktivierung der Adenylat Cyclase aus, die zur Bildung von cAMP führt. Diese Reaktion liegt dem TSAb-Assay zugrunde, in dem der Anstieg von cAMP im Schilddrüsengewebe gemessen wird.

Der Einfluß von Kochsalz und der Phosphodiesterase-Hemmer, Theophyllin und 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (MIX), auf die cAMP-Bildung in diesem System wurde untersucht: Bei 0,45 % NaCl und 10mM Theophyllin im Inkubationsmedium erreichte die cAMP-Bildung die höchsten Werte. Höhere NaCl-Konzentrationen, z.B. 0,9 % NaCl führten zu einem geringeren Anstieg des cAMP im Gewebe, dieser Effekt war nach Inkubation mit MB-IgG deutlicher als nach Inkubation mit TSH.

Zunächst wurden die Versuche mit porcinem Schilddrüsengewebe durchgeführt. Nach TSH-Stimulation beobachteten wir eine deutliche Zunahme des cAMP im Gewebe, die nach vier Stunden ihren Maximalwert erreichte. MB-IgG regte ebenfalls, wenn auch schwächer, die cAMP-Bildung an. Sie erreichte bei Stimulation mit positivem "pool"-IgG aus Serum mehrerer MB-Patienten nach zwei Stunden ein Plateau. IgG (L) und positives "pool"-IgG riefen im menschlichen Gewebe eine stärkere Stimulation hervor; dies spricht für die Speziespezifität der Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper.

Trotz gleicher Inkubationsbedingungen zeigten verschiedene Schilddrüsen aus dem gleichen Schlachthof stark abweichende Antworten auf die gleiche Stimulation. Dieses Phänomen wurde auch bei gleichartig behandelten menschlichen Schilddrüsen beobachtet. Darüber hinaus war die cAMP-Akkumulation humaner Schilddrüsen abhängig vom Funktionszustand des Gewebes.

Der cAMP-Gehalt der Schilddrüsen bei MB und in autonomen Adenomen war basal und nach Stimulation mit TSH IgG höher als in paranodulärem Gewebe, wohl als Hinweis für die bevorstehende funktionelle Aktivität dieser Gewebe im Gegensatz zu dem ruhiggestellten paranodulären Gewebe. Der Anstieg des cAMP über den Basalwert nach TSH war jedoch im paranodulären Gewebe größer.

Die stimulierende Aktivität einzelner MB-IgG am gleichen Schilddrüsenengewebe war unterschiedlich. Nur vier von sechs untersuchten IgG mit positiver TDA führten zu einem signifikanten Anstieg des cAMP. Zwischen TSH-receptorbindender und funktionsstimulierender Wirkung bestand also keine Korrelation.

Untersuchungen des stimulierenden Effektes von MB-IgG am Schilddrüsenoperationsmaterial des betroffenen Patienten zeigten in beiden untersuchten Fällen keinen cAMP-Anstieg im Gewebe. Eines dieser Patienten IgG konnte auch fremdes Schilddrüsenengewebe in vitro nicht stimulieren. Die IgG-Wirkungen, die in vivo für die Unterhaltung der Hypothyreose verantwortlich gemacht werden, kamen in vitro offenbar nicht zum Tragen.

In den Versuchen, bei denen verschiedene Proben zusammengefügt wurden, hatten das hochpotente IgG (L) und Thyrotropin eine additive Wirkung auf die cAMPAkkumulation. MB-IgG (D), das allein keine Stimulation der cAMP-Akkumulation hervorrief, hemmte die Stimulationswirkung des hochpotenten IgG (L) stärker als die von TSH. Wir nehmen an, daß diese inhibitorische Wirkung von gleichzeitig vorhandenen funktionsblockierenden Antikörpern hervorgerufen wird.

Von den drei Fraktionen des an der Protein-Sepharose A aufgetrennten IgG (L) zeigte Fraktion III die höchste Aktivität im TSAb-Assay. Gegenüber dem Gesamt-IgG bestand jedoch keine Zunahme der biologischen Aktivität. MB-IgG (D) ließ erst nach der Auftrennung eine stimulierende Wirkung erkennen: Fraktion II, die im RRA die schwächste TSH-Verdrängung zeigte, führte zu einem Anstieg des cAMP. Wir nehmen an, daß durch die Subfraktionierung blockierende Antikörper in Fraktion II eliminiert wurden; somit konnte die stimulierende Aktivität von IgG (D) zutage treten.

Die cAMP-Zunahme im Inkubationsmedium war nach Stimulation zu gering, als daß aus ihr auf die cAMP-Akkumulation im Gewebe rückgeschlossen werden könnte oder ein diagnostischer Vorteil zu gewinnen wäre.

Auch der Verzicht auf eine IgG-Anreicherung mit dem Ziel eines einfacheren Testsystems war nicht möglich, da nach Inkubation mit Nativserum von MB zwar eine Zunahme von cAMP meßbar wurde, die für diagnostische Zwecke jedoch nicht ausreichte.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- 1) Adams, D.D.; Purves, H.D.:
Abnormal responses in the assay of thyrotropin.
Proc Univ Otago Med Sch 34:11(1956)
- 2) Adams, D.D.; Fastier, F.N.; Howie, J.B.; Kennedy, T.H.;
Kilfsattrick, J.A.; Stewart, R.D.H.:
Stimulating of the human thyroid by infusions of plasma
containing LATS-protector.
J'clin Endocr 39:826(1974)
- 3) Akyol, B:
Charakterisierung von "TSH-displacing activity" (TDA),
Verteilung in den IgG-Subklassen.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
in der Zahnheilkunde an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München
- 4) Baumstark, J.S.; Laffin, R.J.; Bardawil, W.A.:
A preparative method for the separation of 7S gamma globulin
from human serum.
Arch Biochem Biophys 108:514(1964)
- 5) Bech, K.,; Madsen, N.S.:
Thyroid adenylate cyclase stimulating immunoglobulins
in thyroid diseases.
Clin Endocr (Oxf) 8:457(1979)
- 6) Bech, K.:
Immunological aspects of Graves' disease and importance of
thyroid stimulating immunoglobins.
Acta Endocrinol (Copenh) 103 Suppl 254:5(1983)

- 7) Bidey, S.P.; Marshall, N.J.; Ekins, R.P.:
Cyclic AMP release from normal human thyroid slices
in response to thyrotropin.
Acta Endocrinol (Copenh) 95:335(1980)
- 8) Bidey, S.P.; Marshall, N.J. Ekins, R.P.:
Adenylate cyclase activity and the accumulation and release
of adenosine 3',5' - monophosphate in normal human thyroid
tissue slice preparations: responses to thyrotropin and
thyroid - stimulating antibodies.
J Clin Endocrinol Metab 53:246(1981)
- 9) Bitensky, L.; Alaghband-Zadeh, J.; Chayen, J.:
Studies on the thyroid stimulating hormone and the long-acting
thyroid stimulating hormone.
Clin Endocrinol (Oxf) 3:363(1974)
- 10) Bliddal, H.; Bech, K.; Peterson, P.H.;
Siersbaek-Nielsen, K.; Früs, T.:
Evidence of a correlation between thyrotropin receptor binding
inhibition and thyroid adenylate cyclase activation by immuno-
globulins in Graves' disease before and during long-term anti-
thyroid treatment.
Acta Endocr (Copenh) 101:35(1982)
- 11) Carayon, P.; Machia, E.; Fenzi, G.F.; Pinchera, A.;
Lissitzky, S.:
Agonism and antagonism of immunoglobulins from Graves' disease
patients on TSH-stimulated thyroid adenylate cyclase.
In: Autoimmune Aspects of Endocrine Disorders, S. 167,
Pinchera, A.; Doniach, D.; Fenzi, G.F.; Baschieri, L (eds)
Academic Press, New York
- 12) Chiovate, L.; v.d. Gaag, R.D.; Hanafusa, T.; Drexhage, H.A.;
Doniach, D.; Battazzo, G.F.:
Die zunehmende Bedeutung der Rezeptorantikörper in der Thyreo-
idologie.
In: Autoimmunität bei Schilddrüsenerkrankungen (1984), S. 65,
herausgegeben von Schatz, H. und Doniach, D.;
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- 13) Davies, T.F.; Evered, D.C.; Smith, B.R.; Yeo, P.P.B.;
Clark, F.; Hall, R.:
Value of thyroid-stimulating antibody determinations in pre-
dicting short- term thyrotoxic relapse in Graves' disease.
Lancet 1:1181(1977)
- 14) Davies, T.F.:
Autoantibodies to the human thyrotropin receptor are not
species specific.
J Clin Endocrinol Metab 52:426(1981)
- 15) Dorrington, K.J.; Munro, D.S.:
Immunological studies on the long-acting thyroid stimulator.
Clin Sci 28:165(1965)
- 16) Drexhage, H.A.; Bottazzo, G.F.; Doniach, D.; Bitensky, L.;
Chayen, J.:
Evidence for thyroid-growth-stimulating immunoglobulins in
same goitrous thyroid diseases.
Lancet 1980, 2:287(1980)
- 17) Duhamel, R.C.; Schur, P.H.; Brendel, K.; Meezan, E.:
pH gradient elution of human IgG₁, IgG₂ and IgG₄ from protein
A-sepharose.
J Immun 31:211(1979)
- 18) Finke, R.; Kortrella, P.; Wenzel, B.; Bogner, U.;
Meinhold H.; Schleusmer, H.:
Klinische Bedeutung der Bestimmung von Schilddrüsen-
stimulierenden Antikörpern.
Dtsch med Wschr 106:38(1981)
- 19) Gossage, A.A.R.; Byfield, P.G.H.; Copping, S.;
Hornsworth, R.L.:
A comparative study of the binding of Graves' immunoglobulins
by the patient's own and other thyroid membranes.
Clin Endocrinol (Oxf) 14:301(1981)

- 20) Holmes, S.D.; Dirmikis, S.M.; Martin, T.J.; Munro, T.S.:
Effects of human thyroid-stimulating hormone and immuno-
globulins on adenylate-cyclase activity and the accumulation
of cyclic AMP in human thyroid membranes and slices.
J Endocr 79:121(1978).

- 21) Howel Evans, A.W.; Woodrow, J.C.; McDougall, C.D.M.:
Antibodies in the families of thyrotoxic patients.
Lancet 1:636(1967)

- 22) Kasagi, K.; Konishi, J.; Endo, K.; Mori, T.; Nagahara, K.;
Makimorto, K.; Kuma, K.; Torizuka, K.:
Adenylate cyclase activity in thyroid tissue from patients
with untreated Graves' disease.
J Clin Endocrinol Metab 51:492(1980)

- 23) Kasagi, K.; Konishi, J.; Jida, Y.; Iketubo, K.; Mori, T.;
Kuma, K.; Torizuka, K.:
A new in vitro assay for human thyroid stimulator using
cultured thyroid cells. Effect of sordium chloride on adenosine
3',5'-monophospate increase.
J Clin Endocrinol Metab 54:108(1982)

- 24) Kleinmann, R.E.; Braverman, L.E.; Vaginakis, A.G.;
Butcher, R.W.; Clark, R.B.:
A new method for measurement of human thyroid stimulating
immunoglobulins.
J Lab Clin Med 95:581(1980)

- 25) Kohn, L.D.; Valente, W.A.; Laccetti, P.; Cohin, J.L.;
Aloj, S.M.; Grollman, E.F.:
Multicomponent structure of the thyrotropin receptor:
relationship to Graves' disease.
In: The Thyroid and Immunology S. 15,
Werner, S.C. and v. Westarp, C., special editors,
July 24-25, 1982, University of Alverta, Edmonton, Canada

- 26) Kriss, J.P.; Pleshakov, V.; Rosenblum, A; Chien, J.R.:
Isolation and identification of the long-acting thyroid
stimulator and its relation to hyperthyroidism and circum-
scribed pretibial myxedema.
J Clin Endocr Metab 24:1005(1964)
- 27) Kriss, J.P.:
Inactivation of long-acting thyroid stimulator (LATS) by anti-
kappa and anti-lambda antisera.
J Clin Endocr Metab 28:1440(1968)
- 28) Kuzuya, N.; Chin, S.C.; Ikeda, H.; Uchimura, H.;
Ito, K.; Nagataki, S.:
Correlation between thyroid stimulators and 3,5, 3'-triiodor-
thyronine suppressibility in patient during treatment for
hyperthyroidism with thionamide drugs: comparison of assays
by thyroid-stimulating and thyroid-displacing activities.
J Clin Endocr Metab 48:706(1979)
- 29) Kuzuya, N.; Uchimura, H.; Ikeda, H.; Chin, S.C.; Hamada, N.;
Ito, K.; Nagataki, S.:
Adenosine 3',5'-monophosphate concentrations and responsiveness
to thyrotropin and thyroid-stimulating immunoglobulins in
normal and Graves' thyroids.
J Clin Endocrinol Metab 51:59(1980)
- 30) Levey, G.S.; Robinson A.G.:
Introduction to the general principles of hormone-receptor
interactions.
Metabolism 31, 16.7:639(1982)
- 31) Mäenpää, J.:
Hypothyroidism preceding hyperthyroid graves' disease in two
children.
Acta Endocrinol (Copenh) 102 Suppl 251:27(1983)

- 32) Maisey, M.N.:
The IgG class and light chain type of the long-acting thyroid stimulator.
Clin Endocrinol (Oxf) 1:189(1972)
- 33) McKenzie, J.M.:
Delayed thyroid response to serum from thyrotoxic patients.
Endocrinology 62:865(1958b)
- 34) McKenzie, J.M.:
The bioassay of thyrotropin in serum.
Endocrinology 63:372(1958a)
- 35) McKenzie, J.M.:
The long-acting thyroid stimulator: its role in Graves' disease.
Rec Progr Horm Res 23:1(1967)
- 36) McKenzie, J.M.:
Humoral factors in the pathogenesis of Graves' disease.
Physiol Rev 48:252(1968)
- 37) McKenzie, J.M.; Zakarija, M.:
LATS in Graves' disease.
Rec Progr Horm Res 33:29(1977)
- 38) McKenzie, J.M.; Zakarija, M.; Sato, A.:
Humoral immunity in Graves' disease.
Clinics Endocrinol Metab 7:31(1978)
- 39) Morell, A.; Skvaril, F.; Barandun, S.:
Serum concentrations of IgG subclasses.
In: Clinical Immunobiology, volume 3, S. 37,
edited by Bach, F.H.; Good, R.A.
Academic Press New York/San Francisco/London (1976)

- 40) Mukhtar, E.D.; Smith, B.R.; Pyle, G.A.; Hall, R.; Vice, P.:
Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins to thyroid
function and effects of surgery, radioiodine and antithyroid
drugs.
Lancet 1:713(1975)
- 41) Oberdisse, K.; Klein, E.; Reinwein, D.:
Die Krankheiten der Schilddrüse. S. 194,
2. überarbeitete und erweiterte Auflage
1980 Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York
- 42) Ochi, Y.; De Groot, D.J.:
Studies on immunological properties of LATS.
Endocrinology 83:845(1968)
- 43) Ochi, Y.; Yoshimura, M.; Hachiya, T.; Miyazaki, T.:
Immunological studies on LATS-immunoglobulin by the reaction
with staphylococcal protein-A.
Endocrinol Japan 23(2):183(1976)
- 44) Ochi, Y.; Yoshimura, M.; Hachiya, T.; Miyazaki, T.:
Distribution of LATS Activity in Immunoglobulin G subclass.
Acta Endocrinol (Copenh) 85:791(1977)
- 45) O'Donnell, J.; Trokoudes, K.; Raw, V.V.; Volpé, R.:
Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins
from patient with Graves' disease.
J Clin Endocr Metab 46:770(1978)
- 46) Onaya, T.; Kotani, M.; Yamada, T.; Ochi, Y.:
New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera
from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet
formation and cyclic AMP in human thyroid slices.
J Clin Endocr Met 36:859(1973)

- 47) Orgiazzi, J.; Williams, D.E.; Chopra, I.J.; Salomon, D.H.:
Human thyroid adenyl cyclase-stimulating activity in
immunoglobulin G of patients with Graves' disease.
J Clin Endocrinol Metab 42:341 (1976)
- 48) Pochet, R.; Boeynaems, J.M.; Dumont, J.E.
Stimulation by thyrotropin of horse thyroid plasma membranes
adenylate cyclase: evidence of cooperativity.
Biochem Biophys Res Comm 58:446(1974)
- 49) Schleusener, H.; Kotulla, P.; Kruck, I.; Kruck, G.;
Geissler D.; Adlkofer, F.:
Comparison and evaluation of radioligand receptor assay and
the mouse-bioassay for the protection of human thyroid
stimulating immunoglobulins. S. 414
In: Robbins, J.; Braverman, L.E. (eds): Thyroid Research,
Excerpta Medica/Amsterdam (1976)
- 50) Schleusener, H.; Kotulla, P.:
Die Bestimmung Schilddrüsen-stimulierender Antikörper.
Dtsch med Wschr 108:967(1983)
- 51) Schleusener, H.; Henson, J.; Kotulla, P.; Finke, R.;
Schernthaler, G.; Mayr, W.R.; Badenhoop, K.; Wenzel, K.W.;
Kopenhagen, K.; Meinhold, H.:
Wert der Bestimmung Thyreotropin-Bindung-inhibierender
Antikörper (TBIAb), Schilddrüsen-stimulierende Antikörper
(TSAb) und der HLA-Typisierung in der Differenzierung verschie-
dener Formen der Hyperthyreose, S. 28.
In: Autoimmunität bei Schilddrüsenerkrankungen (1984),
herausgegeben von Schatz, H. und Doniach, D.
Georg Thieme Verlag/Stuttgart/New York
- 52) Sober, H.A.; Peterson, E.A.:
Protein chromatography on ion exchange cellulose.
Federation proceedings 17:1116(1958)

- 53) Sugeno, A.; Kidd, A.; Raw, V.; Volpé, R.:
Correlation between thyrotropin-displacing activity and human
thyroid stimulating activity by immunoglobulins from patients
with Graves' disease and other thyroid disorders.
J Clin Endocr Metab 48:398(1979)
- 54) Valente, A.W.; Vitti, P.; Rotella, C.M.; Vaughn, M.M.;
Aloj, S.M.; Grollman, E.F.; Ambesi-Impiombato, F.S.; Kohn, L.:
Antibodies that promote thyroid growth.
N Engl J Med 309:1028(1983)
- 55) Von Verschuer, O.:
Die Zwillingsfälschung im Dienste der inneren Medizin.
Verh dtsch Ges inn Med 64:262(1958)
- 56) Volpé, R.:
The aetiology of thyroid disease.
In: Rational Diagnosis of Thyroid Disease, S. 9,
Proceedings of the Bernstein Workshop, October 1976,
Editor R. Höfer
- 57) Witte A.; Habermann, J.; Pickardt, C.R.;
Is TSH-displacing activity (TDA) a helpful parameter in the
diagnosis and follow-up of Graves' disease?
Acta Endocrinol (Copenh) 99, Suppl 246:65
- 58) Witte, A.; Akyol, B.; Habermann, J.; Pickardt, C.R.:
Further characterization of TSH-displacing activity (TDA):
Distribution in IgG-subclasses.
Acta Endocrinol (Copenh) 102 Suppl 253:126(1983)
- 59) Witte, A.; Akyol, B.; Hörterer, L.; Pickardt, C.R.:
Further characterization of thyrotropin-displacing activity
(TDA): evidence of restricted heterogeneity.
Submitted for publication: J. Endocrinol Invest

- 60) Zakarija, M.; McKenzie, J.M.:
Isoelectric focusing of thyroid-stimulating
antibody of Graves' disease.
Endocrinology 103:1469(1978)
- 61) Zakarija, M.; McKenzie, J.M.:
Zoological specificity of human thyroid-stimulating antibody.
J Clin Endocrinol Metab 47:249(1978)
- 62) Zakarija, M.; McKenzie, J.M.; Banovac, K.;
Clinical significance of assay of thyroid-stimulating antibody
in Graves' disease.
Ann Inter Med 93(part 1): 28(1980)
- 63) Zakarija, M.:
Immunochemical characterization of the thyroid-stimulating
antibody (TSAb) of Graves' disease: evidence for restricted
heterogeneity.
J Clin Lab Immunol 10:77(1983)
- 64) Zakarija, M.; McKenzie, J.M.; Munro, D.S.:
Immunoglobulin G inhibitor to thyroid-stimulating antibody
is a cause of delay in the onset of neonatal Graves' disease.
J Clin Invest 72:1352(1983)

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AA	Autonomes Adenom
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
HTACS	human thyroid adenylate cyclase stimulator
IgG	Immunglobulin der Klasse G
KBR-Puffer	Krebs Ringer Bicarbonate Puffer
MIX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin
MB	Morbus Basedow
RIA	Radioimmunoassay
RRA	Radioreceptorassay
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TDA	TSH displacing activity
TGI	thyroid growth stimulating immunoglobulins
TSAb	thyroid stimulating antibodies
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon

L E B E N S L A U F

Am 22.04.56 wurde ich in Lissabon geboren, wo mein Vater als Rechtsanwalt arbeitete.

1960 trat ich in den Kindergarten der Deutschen Schule Lissabon ein und legte 1973 an derselben Schule die Reifeprüfung ab.

Nach dem Praktischen Jahr in München habe ich das Studium der Humanmedizin, das ich ebenfalls in München begann, im Oktober 1982 mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung abgeschlossen.

Seit Januar 1983 arbeite ich an der vorliegenden Promotionsarbeit.

